
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES DIVERS PROCÉDÉS DE DÉFENSE DE LA CAVITÉ BUCCALE CONTRE L'INVASION DES BACTÉRIES PATHOGÈNES

PAR M. LE D^r HUGENSCHMIDT (DE PARIS)

(Travail du Laboratoire de M. Metchnikoff.)

C'est un fait reconnu, que les opérations pratiquées sur la cavité buccale, même dans des conditions d'antisepsie insuffisantes ou nulles, ne s'accompagnent pas d'ordinaire de complications infectieuses graves.

Après certaines opérations buccales, une avulsion dentaire par exemple, les parties molles traumatisées présentent souvent l'aspect d'une plaie de mauvaise nature : des lambeaux de gencives restent détachés, des fragments osseux, débris des fractures alvéolaires, baignent dans la salive. En un mot, on se trouve en présence d'une véritable fracture compliquée et ouverte, et si on songe aux germes innombrables que renferme la bouche, on a peine à comprendre comment cette plaie ainsi exposée n'est pas d'ordinaire le siège de graves infections locales, et surtout ne devient pas plus souvent la porte d'entrée d'une infection générale de toute l'économie.

On se demande si, comme le pensait déjà J.-L. Petit, « la salive n'est pas un détersif naturel qui cicatrise bien les plaies. »

Dans le présent travail, nous nous sommes attaché à expliquer quelques-unes des causes de cette immunité relative que

présente contre l'infection la cavité bucco-pharyngienne, en montrant le rôle joué par la phagocytose et les propriétés chimiotactiques des liquides buccaux. Mais nous insistons surtout sur la complexité de ces phénomènes, n'ayant pas la prétention, dans un travail aussi restreint, d'expliquer le mécanisme intégral de l'immunité de la cavité buccale.

Lorsqu'on a voulu s'expliquer la remarquable immunité dont jouissent, vis-à-vis des microbes, les tissus qui constituent les parois buccales, on a été porté, à la faveur des idées alors régnantes dans nombre de laboratoires bactériologiques, à invoquer le pouvoir bactéricide ou atténuant de la salive.

Les premières recherches sur l'action bactéricide de la salive sont dues à Sanarelli¹.

Ce savant filtre sur la bougie Chamberland de la salive provenant de plusieurs individus, et la distribue dans une série de tubes à essai, à la dose de 10 à 15 centim. cubes par tube. Cette salive filtrée se présente sous l'aspect d'un liquide transparent neutre ou légèrement alcalin.

Dans chacun des tubes de salive, il introduit une anse de platine d'une culture d'un microbe pathogène, et place les tubes dans une étuve à 37°. Il prélève ensuite, à des périodes différentes, une anse de ce liquide pour ensemençer des plaques enroulées d'Esmarch, puis il étudie les microbes qui s'y développent.

Voici ses conclusions :

1° La salive humaine doit être considérée comme un terrain entièrement défavorable à certains micro-organismes pathogènes, *staphylococcus pyogenes aureus*, *micrococcus tetragenus*, bacille d'Eberth, spirille cholérique;

2° Si le nombre des micro-organismes ensemençés n'est pas considérable, ceux-ci finissent souvent, après une longue période de résistance, par disparaître;

3° Quelques variétés peuvent continuer à se développer, le pneumocoque par exemple; mais ce microbe, s'il conserve sa vitalité, est modifié dans sa forme et surtout dans sa virulence, qui est considérablement atténuée.

Miller² objecte à Sanarelli qu'il n'y a rien d'étonnant à ce que la salive filtrée soit un milieu de culture défavorable aux

1. SANARELLI, *Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenk.* Bd. X, p. 818.

2. MILLER, *Die Mikroorganismen der Mundhöhle.* Leipzig, 1892.

microbes, puisqu'elle ne contient que 0,15 p. 0/0 de matières organiques, tandis que la salive non filtrée, telle qu'elle se trouve dans la cavité buccale, contient une très grande quantité de matières nutritives, débris épithéliaux, mucus, exsudats, etc.

Quant à l'atténuation de virulence du pneumocoque, elle ne prouve pas, pour Miller, l'action de la salive, car ce microbe est tellement fragile qu'il perd sa virulence dans un milieu artificiel quelconque, aussi facilement que dans la salive filtrée.

Miller d'ailleurs ne croit pas aux propriétés bactéricides de la salive, et estime que l'immunité relative de la cavité buccale tient à un pouvoir de résistance tout spécial de la gencive.

Cet expérimentateur ¹ a même inoculé une série de cent onze souris blanches avec des quantités variables de salives non stérilisées : dix seulement résistèrent à l'inoculation, toutes les autres moururent d'infections diverses. D'autre part, Galippe ² a trouvé, d'une façon constante, des microbes dans les conduits excréteurs des glandes salivaires ; faits qui ne sont pas très en faveur d'une action bactéricide salivaire.

Albert Mills ³, dans un travail tout récent, arrive aux conclusions suivantes :

1° La salive, milieu chimique (action toxique des sels), arrête la poussée de la plupart des microbes et agit comme germicide ;

2° La salive, milieu physico-chimique (action plasmolytique des sels), arrête la poussée de la plupart des microbes et leur est germicide ;

3° La salive, milieu physiologique, a une action moindre, à cause de la présence des ferments et matières albuminoïdes qui entrave l'action des sels ;

4° La salive, milieu physiologique, atténue la poussée de la plupart des microbes et prépare l'action du suc gastrique ;

5° Les associations microbiennes salivaires en général augmentent la virulence des germes importés ;

6° La salive stérilisée n'augmente pas la virulence des germes.

Pour vérifier ce pouvoir bactéricide de la salive humaine,

1. MILLER, *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*, 2^e édition, 1892.

2. GALIPPE, *Soc. de biologie*, février 1894.

3. ALBERT MILLS, *Action de la salive et du suc gastrique sur les bactéries*. Bruxelles, 1896.

nous avons entrepris une série d'expériences dont nous allons rapporter les principales.

La salive est recueillie le matin à jeun et distribuée dans des tubes à essais stérilisés. De cette salive, à l'origine, nous faisons deux parts : l'une filtrée sur la bougie Chamberland, l'autre simplement sur du papier à filtre ordinaire stérilisé.

Dans les deux cas, l'action bactéricide s'est montrée la même ; en conséquence nous ne nous sommes servi ensuite que de salive filtrée sur la bougie Chamberland, seul procédé qui permette d'avoir un liquide absolument dépourvu de germes. Nous distribuons la salive ainsi stérilisée à la dose de 2 c. c. dans une série de tubes à essai. Nous ensemençons quelques-uns de ces tubes avec une anse de platine d'une culture de staphylocoque. Nous agitions soigneusement ; puis nous prélevons immédiatement à nouveau une anse de cette salive ensemencée pour la diluer dans un tube de gélatine fondue et l'étaler à la surface d'une boîte de Petri.

Sur d'autres tubes de salive nous pratiquons la même opération, mais au lieu de prélever l'anse de platine pour la mise en plaque aussitôt après l'ensemencement, nous n'opérons ce prélèvement qu'au bout d'une demi-heure, puis d'une heure, puis de vingt-quatre heures, en ayant soin de laisser, dans l'intervalle des prises, la salive ensemencée dans l'étuve à 37°.

Voici les résultats obtenus :

EXPÉRIENCE I

STAPHYLOCOCCUS AUREUS (salive filtrée au Chamberland),
anse de platine.

NOMBRE DE COLONIES SUR PLAQUES DE GÉLATINE

Immédiatement après l'ensemencement	Une demi-heure après l'ensemencement	Une heure après l'ensemencement	24 heures après l'ensemencement	48 heures après l'ensemencement
Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.

EXPÉRIENCE II

TORULA (salive filtrée au Chamberland), anse de platine.

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	24 heures après	48 heures après
254	48	93	318	349

EXPÉRIENCE III

STAPHYLOCOQUE (salive filtrée au filtre ordinaire), anse de platine.

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	24 heures après	48 heures après
—	—	—	—	—
Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.

EXPÉRIENCE IV

TORULA (salive filtrée au filtre simple), anse de platine.

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	24 heures après	48 heures après
—	—	—	—	—
335	69	123	460	473

Une seconde série d'expériences ne nous ayant montré, comme nous l'avons déjà dit, aucune différence d'action entre la salive filtrée à la bougie Chamberland et la salive filtrée au papier, nous n'avons employé dans la suite de nos expériences que la salive filtrée au Chamberland.

On sait, depuis les expériences de Nuttall et Nissen¹, que le sang jouit de propriétés bactéricides, ou, plus exactement, que nombre de germes ensemencés dans ce milieu y meurent sans se développer. Cette propriété bactéricide, comme les propriétés toxiques ou vaccinales de certaines toxines, est extrêmement fragile et ne résiste pas à un chauffage à 55 degrés; il était intéressant de vérifier pour la salive quelle était l'action comparée de la salive non chauffée et chauffée une heure à 60°, et de voir si cette dernière avait conservé des propriétés bactéricides.

EXPÉRIENCE V

TORULA (salive non chauffée).

NOMBRE DE COLONIES SUR PLAQUES DE GÉLATINE

Immédiatement après	Trois quarts d'heure après	Trois heures après	10 heures après
—	—	—	—
5,015	2,845	3,640	7,080

EXPÉRIENCE VI

TORULA (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Trois quarts d'heure	3 heures	10 heures
—	—	—	—
5,566	1,432	1,540	2,838

EXPÉRIENCE VII

SARCINE (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure	1 heure	24 heures
—	—	—	—
90	216	380	1,410

1. Voir ACHALME, *Immunité dans les maladies infectieuses*, p. 73.

EXPÉRIENCE VIII

SARCINE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	24 heures après
—	—	—	—
220	240	560	4,780

Plusieurs expériences faites avec la sarcine isolée de l'estomac humain tendent à ne faire admettre aucune action de la salive chauffée ou non chauffée sur elle.

Au lieu d'ensemencer dans les tubes de salive, pour les expériences suivantes, la quantité de microbes contenus dans une anse de platine, nous avons préféré n'introduire à l'avenir que celle adhérant à l'extrémité pointue d'un fil de platine, ce qui nous permet d'étudier plus aisément l'influence supposée de la salive. On introduit, en effet, de cette façon, dans la salive un nombre bien moins considérable de microbes :

EXPÉRIENCE IX

TORULA (salive chauffée à 60°), pointe de platine).

NOMBRE DE COLONIES SUR PLAQUES DE GÉLATINE

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	24 heures après
—	—	—	—
274	224	210	265

EXPÉRIENCE X

TORULA (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	24 heures après
—	—	—	—
378	264	276	425

EXPÉRIENCE XI

TORULA (salive chauffée à 60°)

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	4 heures après
—	—	—	—
16	35	35	118

EXPÉRIENCE XII

TORULA (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	4 heures après
—	—	—	—
25	26	110	848

EXPÉRIENCE XIII

STREPTOCOQUE (salive non chauffée).

NOMBRE DE COLONIES SUR PLAQUES DE GÉLATINE

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	8 heures après
—	—	—	—
230	276	312	3,778

EXPÉRIENCE XIV

STREPTOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	8 heures après
—	—	—	—
143	198	179	2,608

La pointe de platine imprégnée de staphylocoque donnant une culture liquéfiée au bout de 24 heures, nous diluons une pointe de platine de culture dans 1 centim. cube de solution physiologique de chlorure de sodium.

EXPÉRIENCE XV

STAPHYLOCOQUE (salive non chauffée).

NOMBRE DE COLONIES SUR PLAQUES DE GÉLATINE

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	4 heures après
—	—	—	—
13	3	7	25

EXPÉRIENCE XVI

STAPHYLOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	4 heures après
—	—	—	—
115	63	21	188

EXPÉRIENCE XVII

STREPTOCOQUE (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	8 heures après
—	—	—	—
33	71	58	3,120

EXPÉRIENCE XVIII

STREPTOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	8 heures après
—	—	—	—
1,647	3,400	4,635	19,920

EXPÉRIENCE XIX

STAPHYLOCOQUE (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après
—	—	—
6	6	5

EXPÉRIENCE XX

STAPHYLOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après
—	—	—
67	7	5

EXPÉRIENCE XXI

STAPHYLOCOQUE (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
400	160	264	Liquéfiée.

EXPÉRIENCE XXII

STAPHYLOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
5,185	5,220	3,105	6,160

EXPÉRIENCE XXIII

STAPHYLOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
59	36	88	220

EXPÉRIENCE XXIV

STREPTOCOQUE (salive non chauffée).

(Deuxensemencements.)

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
18	23	—	340
28	37	Pas de culture.	360

EXPÉRIENCE XXV

STREPTOCOQUE (salive chauffée à 60°)

(Deuxensemencements.)

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
32	61	28	520
27	41	38	480

EXPÉRIENCE XXVI

STAPHYLOCOQUE (salive non chauffée).

(Deuxensemencements.)

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
27	30	36	340
32	27	40	530

EXPÉRIENCE XXVII

STAPHYLOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
22	23	31	200
22	21	15	320

EXPÉRIENCE XXVIII

STREPTOCOQUE (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	Une heure après	8 heures après
—	—	—	—
40	8	17	387

EXPÉRIENCE XXIX

STREPTOCOQUE (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	8 heures après
—	—	—	—
19	15	26	403

EXPÉRIENCE XXX

CHOLÉRA DE MASSOUAH. Culture de 18 heures (non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après	24 heures après
—	—	—	—	—
220	236	248	11,340	32,627

EXPÉRIENCE XXXI

CHOLÉRA DE MASSOUAH. Culture de 18 heures (salive chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après	24 heures après
—	—	—	—	—
108	280	496	10,800	60,939

EXPÉRIENCE XXXII

CHOLÉRA DE MASSOUAH (salive non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après	24 heures après
—	—	—	—	—
208	276	620	12,960	36,783

EXPÉRIENCE XXXIII

CHOLÉRA DE MASSOUAH (chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après	24 heures après
—	—	—	—	—
344	392	644	18,900	89,487

EXPÉRIENCE XXXIV

CHOLÉRA DE CONSTANTINOPLE. Culture de 18 heures (non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après
—	—	—	—
140	240	440	2,160

EXPÉRIENCE XXXV

CHOLÉRA DE CONSTANTINOPLE (chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après
—	—	—	—
100	380	410	3,600

EXPÉRIENCE XXXVI

CHOLÉRA DE CONSTANTINOPLE (non chauffée).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après
—	—	—	—
140	388	540	2,100

EXPÉRIENCE XXXVII

CHOLÉRA DE CONSTANTINOPLE (chauffée à 60°).

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après
—	—	—	—
128	464	644	pas de culture.

En résumé :

Sur la torula, action peu marquée de la salive non chauffée : action certainement plus grande de la salive chauffée à 60°.

Sur la sarcine, aucune action, — cette bactérie se développe aussi bien dans la salive chauffée que dans celle non chauffée.

Le développement du streptocoque n'est nullement influencé par le liquide salivairé chauffé ou non chauffé; il n'est donc pas surprenant, comme MM. Widal et Bezançon l'ont démontré, que sa présence dans la bouche soit constante.

Sur le staphylocoque doré, l'action est certainement plus manifeste que sur les bactéries précédentes, et la salive chauffée à 60° est plus bactéricide que celle non chauffée.

Pour le choléra, l'action est tout à fait nulle, le vibron cholérique se développant très rapidement dans le milieu salivaire.

S'il existe une différence d'action, elle est due à l'origine de la bactérie ; en effet, on constate, sept heures après le premier ensemencement, que le développement du vibron cholérique provenant de Massouah est beaucoup plus rapide que celui de Constantinople.

Comme on peut le voir, l'action bactéricide de la salive nous paraît des plus problématiques. Nous n'avons jamais pu la constater d'une façon bien évidente sur aucun des microbes employés. Dans des cas nombreux, les microbes introduits dans la salive poussent rapidement, de sorte que leur nombre, au bout d'un temps très court, devient notablement plus considérable. Parfois il y a, au début, une certaine lenteur dans la croissance, ou même on constate la destruction de certains des microbes ensemencés, mais il faut se rappeler que le simple passage des microbes d'un milieu dans un autre peut amener la destruction partielle de ces microbes.

Les expériences de Halkine ont montré que des infusoires meurent rapidement si on les transporte d'une eau dans une autre, un peu dissemblable par sa composition chimique ; le même auteur a montré que le bacille d'Eberth, acclimaté dans un milieu peu favorable à son développement, ne végète qu'avec peine lorsqu'on le réensemence dans un milieu plus favorable pour l'espèce, dans du bouillon peptonisé.

Ce qui confirme notre manière de voir, c'est que, dans nos expériences, ce semblant d'action bactéricide se constate non seulement lorsqu'il s'agit de salive intacte, mais encore avec la salive chauffée à 60 degrés, dépourvue par conséquent des principes bactéricides analogues à celui du sérum sanguin. Nous dirons même plus, nous avons trouvé pour la torula et le staphylocoque que la salive chauffée à 60° avait un pouvoir plus bactéricide que celle non chauffée. Il n'y a donc à établir aucune comparaison, même éloignée, entre le prétendu pouvoir bactéricide de la salive et celui que le sérum peut manifester vis-à-vis de certains microbes.

L'étude attentive de l'immunité a d'ailleurs montré que les propriétés bactéricides du sérum ne peuvent expliquer la résis-

tance des animaux à l'envahissement par les virus. Nous sommes donc, *à fortiori*, autorisé à conclure que l'immunité des parois buccales contre les infections n'est pas due à une propriété germicide de la salive.

Rôle mécanique de la salive. — Si la salive n'a pas, par ses propriétés bactéricides, l'importance qu'ont voulu lui attribuer certains auteurs, son rôle dans la protection buccale est cependant considérable.

La sécrétion parotidienne et celle des autres glandes salivaires a en effet une grande utilité; c'est elle qui, par son action mécanique, dilue les bactéries, les agglutine et les entraîne de la cavité pharyngée dans l'estomac où elles subissent l'action destructive du suc gastrique.

Dans toutes les maladies où cette sécrétion salivaire diminue, chez les cachectiques, dans les états infectieux ataxiques et adynamiques, la bouche devient sèche, les lèvres fuligineuses, et la cavité bucco-pharyngée, si bien protégée d'ordinaire, devient la porte d'entrée la plus importante peut-être pour les infections secondaires.

La salive joue encore un rôle important, par deux procédés d'action mécanique : elle dilue les détritits alimentaires, les entraîne, empêche leur stagnation et, par suite, leur fermentation; elle entrave encore les fermentations en raison de sa réaction alcaline¹.

ROLE DU SULFOCYANURE DE POTASSIUM

On sait que la présence réelle de ce sel dans la salive a été niée par plusieurs expérimentateurs, entre autres par Berzélius, Lehmann, Claude Bernard même qui attribuait son existence dans la salive à la présence de la carie dentaire dans la bouche. Longet, Schiff en font, au contraire, un élément constant de la salive humaine dans des proportions variant de 0,10 à 0,20 0/00.

Longet l'a trouvé constamment, aussi bien dans la salive sous-maxillaire que dans la sublinguale ou parotidienne : ses proportions variables dépendent de la concentration du liquide salivaire; il n'y a aucune relation entre l'état des dents et la présence de ce sel. On peut se demander, et même cette hypo-

1. MENDEL JOSEPH, *Odontologie*, décembre 1892. — L. FREY et SAUVEZ, Des moyens de résistance de la dent contre la carie. *Gaz. des hôpitaux*, avril 1893.

thèse a déjà été formulée, si ce sulfocyanure de potassium ne jouerait pas le rôle d'un agent antiseptique de la salive (Sanarelli). — Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait la série d'expériences suivantes :

Nous avons employé des solutions de 0,06 0/00, 0,10 0/00 et 0,20 0/00 de sulfocyanure de potassium dans de l'eau distillée d'une part, dans de l'eau physiologique d'autre part, mais nous n'avons constaté aucune action empêchante; voici du reste une des expériences faites avec une solution à 0,10 0/00.

Nous avons pris une pointe de platine d'une culture de staphylocoque que nous avons transportée dans un petit tube contenant 2 c. c. de solution de sulfocyanure, puis nous avons immédiatement prélevé une pointe de cette solution pour ense-
mencer un tube de gélatine. que nous versons dans une plaque de Petri. Le liquide est mis à l'étuve à 37°, et une demi-heure après nous faisons un second ensemencement, puis une heure, et enfin vingt-quatre heures après.

SOLUTION DE SULFOCYANURE DE POTASSIUM A 0,10 0/0
BACILLE D'EBERTH.

NOMBRE DE COLONIES SUR PLAQUES DE GÉLATINE			
Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après
—	—	—	—
364	195	212	203

STAPHYLOCOCCUS PYOGENES 'AUREUS

Immédiatement	Une demi-heure après	1 heure après	7 heures après
—	—	—	—
600	420	462	1,400

Ces expériences, répétées avec des solutions de 0,06 0/00 et 0,20 0/00, ont donné le même résultat négatif. L'action du sulfocyanure de potassium dans la salive comme antiseptique salivaire est donc des plus contestables, pour ne pas dire absolument nulle, et ne joue aucun rôle bactéricide.

ROLE DE LA PHAGOCYTOSE ET DES PROPRIÉTÉS CHIMIOTACTIQUES POSITIVES
DE LA SALIVE NON FILTRÉE

Si les propriétés bactéricides de la salive restent très problématiques, il n'en est pas de même du rôle joué par la fonction

phagocytaire dans la protection de l'organisme en général et de la cavité buccale en particulier.

Les diverses espèces de leucocytes contractiles et phagocytaires, les leucocytes polynucléaires surtout se rencontrent en grand nombre dans le derme sous-jacent aux muqueuses de revêtement; dans la bouche en particulier, leur nombre semble particulièrement important, et il existe pour ainsi dire, derrière la membrane épithéliale, un véritable lac lymphatique. C'est surtout au niveau de l'arrière-gorge que cette formation lymphatique prend une importance considérable. Outre les deux amygdales qui ne sont autre chose que deux centres lymphatiques en contact intime avec la muqueuse buccale qui, par suite de ses lacunes et de ses cryptes, multiplie encore les relations de la cavité bucco-pharyngée et des organes lymphatiques, il existe, sur toute la cavité de l'arrière-gorge, une couche presque ininterrompue de follicules lymphatiques : les uns isolés et répartis sans ordre, occupant la paroi postérieure du pharynx, les autres sous forme de traînées verticales, doublant de chaque côté le pilier postérieur du voile du palais, les autres étalés sur la face dorsale de la langue, constituant une sorte de nappe comprise entre le V lingual et les papilles caliciformes, l'épiglotte et les tonsilles¹. Signalons enfin les amas folliculaires, dits amygdales palatines, et l'amygdale pharyngienne de Luschka.

De nombreux leucocytes provenant de ces centres lymphatiques arrivent sans cesse à la surface de la muqueuse; ce phénomène a été bien montré par Stoer. Cet exode est démontré par leur présence dans les sécrétions et par l'examen microscopique de la muqueuse, où l'on peut voir le passage des cellules migratrices entre les cellules épithéliales.

La leucocytose, c'est-à-dire l'acte nécessaire à la phagocytose, est donc un acte physiologique que l'on observe facilement dans la cavité bucco-pharyngée.

On sait d'autre part que, selon les circonstances, cette leucocytose est activée ou empêchée.

Les leucocytes présentent, en effet, une sensibilité propre qui leur permet de se diriger activement vers un but; comme

1. JEANSELME, De l'arrière-gorge et de l'amygdale en particulier, considérés comme porte d'entrée des infections. *Gaz. des hôpitaux*, 25 janvier 1890.

toutes les sensibilités, la leur peut se décomposer, et sa modalité la plus intéressante au point de vue qui nous occupe est, sans contredit, leur sensibilité chimiotactique, c'est-à-dire la propriété d'être attirés par certaines substances et repoussés par d'autres.

Étudiée d'abord sur des végétaux inférieurs par Pfeiffer, l'action attractive et répulsive de certains agents a été étendue aux leucocytes surtout par MM. Massart et Bordet qui ont bien montré les propriétés chimiotactiques des cellules blanches. En introduisant dans la cavité péritonéale d'un animal de petits tubes capillaires contenant le corps dont on veut rechercher l'influence, ces savants virent qu'en cas de chimiotaxie positive, les leucocytes pénètrent en grand nombre dans le tube. Un grand nombre de microbes sont doués de ces propriétés chimiotactiques positives.

La salive étant un milieu de culture où l'on trouve un nombre considérable de microbes, on peut penser que ceux-ci sécrètent des substances capables d'exercer sur les leucocytes une influence chimiotactique positive, et le fait est d'autant plus plausible qu'il y a, par suite de l'état négatif dans lequel se trouvent les microbes de la bouche, une véritable accoutumance entre leurs toxines et les leucocytes. M. Massart a d'ailleurs montré comment, par une sorte d'éducation préalable, une cellule vivante peut être attirée par une substance jouissant auparavant de propriétés chimiotactiques négatives.

Appliquant à la bouche ces données générales, on peut formuler l'hypothèse que la salive à l'état normal exerce sur les leucocytes une attraction continue qui hâte l'afflux des phagocytes, favorisant ainsi la réaction protectrice, et que cette action, s'exerçant de même à la surface de la plaie dans les cas de traumatisme, permet un afflux abondant de leucocytes qui viendront englober les bactéries introduites avec la salive dans la plaie.

Pour constater si la salive a réellement des propriétés attractives vis-à-vis des leucocytes, nous nous sommes servi de la technique même employée par les expérimentateurs qui ont décelé la propriété chimiotactique des globules blancs. On laisse déposer, dans un tube à réactif, de la salive humaine prise le matin; on décante, au bout de quelques heures de séjour à la température ordinaire, la partie supérieure devenue plus claire,

puis on introduit de petites quantités de ce liquide dans des tubes capillaires, tubes que l'on ferme à une extrémité; on les introduit ensuite, par faisceaux, dans la cavité péritonéale d'un cobaye, où ils restent huit heures, au bout desquelles on les retire, et l'on trouve que les leucocytes ont formé, dans l'intérieur du tube, une bourre épaisse et longue de 2 millim. environ.

La même expérience fut répétée sur la souris et nous donna des résultats analogues.

De plus, dans une autre série d'expériences faites avec de la salive ayant séjourné 24 heures à l'étuve, et où le nombre de microbes a considérablement augmenté, on constate que la bourre formée par les leucocytes dans les tubes capillaires est visiblement plus grande. La valeur de l'attraction exercée sur les leucocytes est donc en relation même avec l'intensité de la culture, et par conséquent avec la quantité des produits microbiens présents dans le liquide.

Mais cette expérience nous dit seulement que la salive d'homme attire d'une manière très positive les leucocytes de cobaye ou de souris. Il y aurait donc intérêt à savoir si la salive d'un animal attire les leucocytes du même animal. Nous avons fait sur le cobaye une expérience qui répond à cette question par l'affirmative.

EXPÉRIENCE. — On recueille au moyen d'un tube effilé de la salive de cobaye, qu'on a soin d'examiner au microscope. On constate que le liquide obtenu fourmille de microbes : on remarque particulièrement des bacilles assez minces et rectilignes qui prennent le Gram, un streptocoque, de gros diplocoques qui se colorent également par la méthode de Gram, un bacille long et très fin qui se décolore par ce procédé, un coccobacille présentant la même particularité et ressemblant beaucoup au pneumocoque de Friedländer.

On remplit des tubes capillaires avec cette salive et on les introduit avec des précautions de rigoureuse asepsie dans la cavité péritonéale de l'animal dont cette salive provient. Au bout de dix heures on retire ces tubes. On constate l'afflux des leucocytes qui remplissent une partie notable des tubes capillaires.

Les leucocytes, étalés sur une lame et colorés, apparaissent sous forme de cellules polynucléaires. Ces leucocytes sont, on le

voit, les phagocytes les plus actifs, et certaines de ces cellules contiennent dans leur protoplasma des microbes apportés par la salive.

On a eu soin, dans toutes ces expériences, de préparer non seulement des tubes capillaires contenant la salive à examiner, mais aussi d'autres tubes remplis soit de substance attirant sûrement les leucocytes (bouillon de culture ensemencé avec du staphylocoque doré), soit de matières n'exerçant sur les leucocytes aucune influence attractive (solution aqueuse de NaCl à 0,60 0/0), que l'on introduit dans la cavité abdominale des cobayes. Ces tubes jouent le rôle de témoins.

De ce qui précède on peut déduire que, lorsqu'une plaie est produite dans la bouche, artificiellement ou accidentellement, la salive imbibant la lésion exerce sur les leucocytes une influence attirante dont les effets deviennent d'autant plus marqués, que cette influence s'exerce d'une manière constante et prolongée.

Il reste cependant à contrôler expérimentalement si les phagocytes d'un animal, d'un cobaye par exemple, sont capables d'englober et de digérer les microbes qui se cultivent dans la sécrétion salivaire. On peut, à ce point de vue, étudier très facilement les leucocytes de cobaye, en retirant à cet animal un peu d'exsudat péritonéal, dont on a eu soin d'augmenter préalablement le nombre de phagocytes, au moyen d'une injection, pratiquée 24 heures auparavant, de bouillon peptonisé.

Si l'on mélange un peu de cet exsudat avec de la salive, et si on transporte la gouttelette ainsi obtenue à l'étuve (température de 35°) en empêchant l'évaporation par l'emploi d'une chambre humide, les phagocytes peuvent exercer leurs fonctions d'englobement et s'emparer des microbes mis en contact avec eux.

EXPÉRIENCES. — *a*) SALIVE HUMAINE. — Les leucocytes de cobaye sont mêlés à de la salive humaine qu'on a laissée déposer quelques heures pour en séparer les débris alimentaires ou autres éléments cellulaires. La préparation reste à l'étuve pendant une heure; on étend ensuite le liquide sur des lames, on fixe, puis on colore par le procédé d'Ehrlich, c'est-à-dire par l'emploi successif de l'éosine et du bleu de méthylène.

La préparation est mise en présence de chacun des colorants pendant quatre à cinq minutes.

On constate à l'examen des préparations que les leucocytes se sont emparés des microbes avec beaucoup d'avidité. On reconnaît que, parmi les espèces microbiennes variées que contient la salive, il n'en est pas une dont on ne trouve quelques représentants dans le protoplasma des leucocytes.

b) SALIVE DE COBAYE. — On recueille une petite quantité de la salive de cet animal et on la mélange à des leucocytes provenant de la cavité péritonéale du même cobaye. On transporte les préparations à l'étuve où elles restent 2 heures, et l'on constate, après coloration, qu'au bout de ce temps l'englobement des divers microbes est aussi complet que possible.

Deux faits sont désormais acquis : la salive attire les leucocytes et favorise, par conséquent, lorsqu'une plaie se produit dans la bouche, l'afflux rapide de ces éléments protecteurs. Les leucocytes sont capables de s'emparer avec beaucoup d'énergie des différents microbes présents dans la cavité buccale et de les réduire à néant.

Il reste à constater, *de visu*, l'activité de l'englobement au niveau d'une plaie produite artificiellement dans la bouche.

EXPÉRIENCE. — On recueille, chez un cobaye, une trace de salive et on en fait des préparations que l'on colore, les unes par le bleu de méthylène, les autres par le Gram. On pratique ensuite, vers la partie médiane de la gencive du maxillaire inférieur, la résection de la muqueuse sur une faible étendue et on gratte ensuite, au moyen d'une curette, la plaie dénudée. Vingt heures plus tard, on trouve que la plaie est recouverte d'un enduit blanchâtre, constitué par des leucocytes — presque tous polynucléaires, quelques-uns mononucléaires ; on étale ces leucocytes sur lame et on colore.

Dans le protoplasma de ces cellules, on décèle facilement la présence de microbes variés, semblables par leur forme, leurs caractères de coloration, à ceux que l'on rencontre dans les préparations de la salive. Un nombre assez considérable de microbes englobés se colorent moins énergiquement que ceux qui sont restés libres dans le liquide ambiant, c'est là une preuve de la destruction phagocytaire. Certains d'entre eux, contenus dans le protoplasma phagocytaire, absorbent l'éosine

au lieu de se teindre par leur colorant naturel, le bleu de méthylène.

EXPÉRIENCE. — La salive de l'animal contient des cocci, mais on n'y trouve pas de chaînettes streptococciques. Il est facile d'introduire quelques gouttes d'une culture virulente de streptocoques dans la bouche, et de voir si l'englobement a lieu. On verse dans la bouche d'un cobaye, porteur d'une plaie que l'on a eu soin de bien nettoyer, quelques gouttes d'une culture très active de streptocoque.

Quatre heures plus tard, on racle légèrement la surface de cette plaie, on y recueille ainsi un exsudat riche en leucocytes, et dans quelques-unes de ces cellules on trouve des chaînettes streptococciques analogues à celles qui peuplent la culture.

Le lendemain, la plaie est en pleine voie de cicatrisation et se guérit bientôt sans aucun accident. Les mêmes faits de phagocytose et de destruction par les leucocytes de microbes existant dans la bouche peuvent encore se rencontrer, si l'on introduit dans la gencive d'un animal un corps étranger, une fine écharde de bois par exemple. Il se produit bientôt autour du corps étranger une petite quantité de pus formé de leucocytes dont plusieurs contiennent des bactéries, des cocci, provenant de la salive.

Dans les leucocytes, les microbes deviennent beaucoup moins colorables, car ils sont partiellement dégénérés ; hors des leucocytes, ils gardent leur aspect normal.

On peut donc conclure que la résistance des tissus constituant les parois buccales, vis-à-vis des agents microbiens si abondants dans la bouche, est due à l'énergie de la phagocytose, fonction générale.

RÔLE CHIMIOTACTIQUE DE LA SALIVE FILTRÉE

Dans les expériences précédentes, nous avons employé la salive telle que nous la trouvons dans la cavité buccale, chargée de microbes et non filtrée ; c'est elle, en effet, qui nous intéresse au point de vue clinique, mais on pouvait nous objecter que cette propriété chimiotactique positive de la salive pourrait bien ne pas être due au liquide salivaire lui-même, mais bien à la présence des bactéries dans ce liquide ; c'est en effet ce qui résulte de l'expérience suivante :

Nous avons recueilli à jeun de la salive humaine dans des tubes stérilisés. Une heure après, cette salive fut filtrée au filtre Chamberland. Nous avons pris alors une série de six tubes capillaires dans lesquels nous avons fait pénétrer de la salive filtrée ; ces tubes furent fermés à une extrémité ; puis une autre série de six tubes dans lesquels nous avons mis de l'eau physiologique, et enfin six tubes contenant une culture de choléra. Ces trois faisceaux attachés séparément ont été placés dans la cavité péritonéale d'un cobaye et laissés en place dix heures.

En les retirant, nous avons constaté que les tubes contenant la culture cholérique présentaient une bourre épaisse de phagocytes ; tandis que, dans ceux contenant la salive, les leucocytes avaient certainement pénétré, mais en si petit nombre, que la propriété chimiotactique de la salive filtrée peut être considérée comme neutre. Les tubes contenant l'eau physiologique ne présentaient aucune trace de pénétration des phagocytes.

RÔLE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET DE LA CONCURRENCE VITALE DES MICROBES

L'action phagocytaire n'est pas la seule qu'il nous faille invoquer parmi les causes de destruction des bactéries : un mode additionnel de protection de la cavité buccale en général, et des gencives en particulier, contre l'invasion des microbes pathogènes, est cette propriété très générale que possèdent les épithéliums pavimenteux stratifiés de se renouveler continuellement dans leurs couches superficielles. De même qu'à la surface de la peau les cellules cornées sont en desquamation permanente, de même, dans la cavité bucco-pharyngée, les cellules épithéliales se renouvellent constamment. Cette desquamation s'accroît surtout pendant la mastication, des quantités énormes de cellules sont alors rejetées, et l'on peut dire qu'après chaque repas, la surface de revêtement de la cavité buccale a été renouvelée. Or, nous l'avons dit, si les cellules épithéliales ne sont pas douées de propriétés phagocytaires, elles sont tapissées à leur surface, chargées dans leurs interstices, parfois même pénétrées dans leur intérieur par d'innombrables bactéries qui seront délogées et entraînées en même temps qu'elles avec la salive dans le canal alimentaire où l'estomac les détruira bientôt.

On pourrait également, fait déjà indiqué par M. Mendel

Joseph¹, faire ressortir, aujourd'hui que nos connaissances sur les actions réciproques des microbes sont devenues plus complètes, qu'une atténuation de la virulence d'un microbe, à faible végétabilité ou qui ne se trouve qu'en faible quantité dans la bouche, peut vraisemblablement être due, non pas à la salive elle-même, mais aux micro-organismes de tout genre qui peuplent ce liquide. Il est tout à fait certain que, dans la bouche, certaines races microbiennes qui sont particulières à cette région, poussent plus vigoureusement que les autres dans la salive, et que leur développement peut étouffer l'expansion de microbes plus fragiles, tout au moins en diminuer la vitalité et en rendre moins actives les facultés pathogènes. Les microbes se gênent mutuellement, et cette action d'empêchement doit porter surtout sur les races qui ne sont pas très adaptées au milieu nutritif où elles se trouvent.

Le pneumocoque, par exemple, peut se trouver dans la salive, mais son développement n'y est jamais aussi luxuriant que celui des bactéries, dont la salive est le milieu de culture propre, qui sont déjà, depuis longue date, adaptées à y vivre, qui y sont en quelque sorte chez elles.

Les saprophytes vulgaires de la salive sont donc ceux qui, dans la concurrence entre les espèces, ont sans doute le plus de chance d'être victorieux et de réfréner le développement d'autres microbes, se rencontrant accidentellement dans la bouche.

Cette concurrence vitale, nous la voyons partout comme un des principaux agents de destruction des bactéries introduites accidentellement dans un milieu.

Dans la cavité vaginale, les expériences de Menge² l'ont montré, elle joue le plus grand rôle. L'antagonisme entre les bacilles vaginaux ordinaires et les micro-organismes introduits artificiellement est un facteur de premier ordre dans le mécanisme de l'auto-aseptisation du vagin. Très nombreux d'abord, les microbes introduits artificiellement, bacille pyocyanique, streptocoque, staphylocoque pyogenes aureus, ne tardent pas à disparaître, de sorte qu'au bout d'un temps plus ou moins long, le vagin ne présente plus un seul des micro-organismes introduits.

On peut donc conclure que la résistance des tissus constituant

1. *Odontologie*, décembre 1892.

2. MENGE, *Deutsche Mediz. Wochenschrift*, 15, 22, 29 nov. 1894.

les parois buccales, vis-à-vis des agents microbiens si abondants dans la bouche, est due à l'énergie de la phagocytose, fonction générale, mais favorisée ici d'une façon toute spéciale grâce à la constance de l'attraction exercée sur les leucocytes par les produits microbiens présents et dissous dans la salive. Il ne faudrait pas oublier cependant la destruction d'un grand nombre de bactéries par la desquamation incessante et la diminution du nombre des espèces par la concurrence vitale.

La cavité bucco-pharyngée est un milieu qui change sans cesse dans sa constitution, et il en est sans doute de la défense de la bouche contre les espèces microbiennes, comme de la défense contre les poisons : la moindre mutation suffit peut-être à en changer les conditions. Ne savons-nous pas que l'acidité de la salive, telle qu'on la constate au lendemain de libations trop copieuses, suffit à faciliter l'absorption du plomb par la muqueuse buccale, d'où la facilité de l'intoxication saturnine chez les alcooliques.

En résumé, si les propriétés bactéricides de la salive ne sont pas démontrées par l'expérimentation, et si l'on peut même douter de leur rôle dans l'atténuation de la virulence des microbes pathogènes qui sont les commensaux habituels de la cavité bucco-pharyngée, il n'en est pas de même des propriétés chimiotactiques positives de cette même salive non filtrée, telle qu'elle se rencontre dans la cavité buccale.

Par ses propriétés mêmes et surtout par l'intermédiaire des produits solubles des microbes qui y végètent, la salive possède des propriétés chimiotactiques positives qui expliquent la diapédèse importante se faisant dans la bouche normale pour détruire les bactéries. Cette diapédèse est intense surtout à la surface des plaies baignées par la salive dans les cas pathologiques.

Quant au sulfocyanure de potassium, s'il existe réellement dans la salive, son action bactéricide ou antiseptique est nulle.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

DES ACCIDENTS POST-SÉROTHÉRAPIQUES

PAR MM.

A. BÉCLÈRE

Médecin de l'hospice Debrousse.

CHAMBON ET MÉNARD

Directeurs de l'institut de vaccine animale de Paris.

Au cours de recherches sur l'immunité vaccinale, nous avons été amenés à faire à des animaux de l'espèce bovine des injections sous-cutanées de sérum de solipèdes, d'âne et de cheval. Ainsi s'offrit à nous l'occasion de constater que du sérum de cheval, introduit en grande quantité sous la peau d'une génisse, lui donne de la fièvre, des éruptions polymorphes simulant l'urticaire ou la rougeole, et même des arthropathies, en un mot des accidents très analogues, pour ne pas dire identiques, à ceux qui dans l'espèce humaine succèdent assez souvent à l'injection sous-cutanée des divers sérums thérapeutiques.

Nous avons fait à quatre génisses des injections de sérum de cheval; pour chaque génisse nous avons employé un sérum de provenance différente. Des quatre chevaux qui nous ont fourni du sérum, deux ont été mis à notre disposition par M. le professeur Nocard avec une obligeance dont nous lui demeurons très reconnaissants; le troisième, appartenant à une grande administration, avait servi pour une expérience à M. le professeur Chauveau qui nous a libéralement permis d'en faire usage après lui; enfin nous avons plaisir à remercier M. Humbert, médecin-vétérinaire de l'armée, de la grande amabilité avec laquelle il nous a offert du sang de son propre cheval pour nos dernières recherches. C'est M. Nocard qui a bien voulu saigner lui-même ces chevaux et recueillir leur sérum. Deux autres génisses ont reçu en injection sous la peau du sérum d'âne récolté aussi par M. Nocard. Antérieurement nous avons fait à treize génisses des injections de sérum provenant d'animaux de leur espèce. Nous avons donc pu comparer l'action sur l'espèce bovine des diffé-

rents sérums de génisse, d'âne et de cheval introduits par la voie sous-cutanée.

Les résultats de nos injections de sérum de génisse ont été publiés ici même¹. Ce sérum provenait d'animaux vaccinés. En dehors du pouvoir immunisant que nous lui avons reconnu et de son action abortive sur l'éruption vaccinale, il n'a jamais provoqué chez les génisses auxquelles il a été injecté le moindre trouble.

Au contraire, les génisses qui ont reçu du sérum de cheval ont toutes les quatre présenté un exanthème généralisé avec élévation de la température; l'une d'elles a montré en outre des troubles fonctionnels de l'appareil locomoteur qu'il nous a paru légitime de rattacher à des arthropathies.

Les deux génisses qui ont reçu du sérum d'âne n'ont rien offert de semblable à notre observation.

Voici d'ailleurs la relation détaillée de nos expériences :

EXPÉRIENCE I. — Le 14 février 1896, dans la matinée, une génisse de six mois, pesant 109 kilogrammes, reçoit en deux injections successives sous la peau du cou une quantité de sérum de cheval égale à 1090 centimètres cubes, c'est-à-dire équivalente au centième de son poids. Ce sérum nous a été fourni par M. Nocard qui a bien voulu le recueillir lui-même. Il provient d'un cheval qui depuis cinq ans séjourne à Alfort sans y avoir été atteint de horse-pox; c'est le point de vue spécial qui nous occupe, mais nous savons en outre qu'il n'a jamais été immunisé contre la diphtérie. Immédiatement après l'injection de sérum, la génisse est inoculée aux deux côtés du tronc avec du vaccin éprouvé, suivant le mode adopté à l'établissement vaccinal de la rue Ballu. Une génisse témoin est aussitôt inoculée de semblable façon avec le même vaccin.

Le 16 février, le sérum injecté sous la peau a été en grande partie absorbé; il reste cependant à la base de l'encolure une boule œdématense du volume d'une pomme.

Le 17 février, l'absorption du sérum est complète, il ne subsiste plus trace de l'injection.

Le 18 février, après quatre jours écoulés, les deux génisses commencent à présenter des vésicules vaccinales naissantes. Chez la génisse qui a reçu du sérum de cheval, on voit apparaître sur les deux champs vaccinaux, dans l'intervalle des inoculations, une éruption singulière dont la couleur tranche vivement sur la blancheur normale du derme soigneusement rasé. Cet exanthème est constitué sur le côté droit par de nombreuses taches d'un rouge rosé, irrégulièrement arrondies, de diamètre inégal et à contours

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, n° du 25 janvier 1896. Etudes sur l'immunité vaccinale et le pouvoir immunisant du sérum de génisse vaccinée, par MM. Béchère, Chambon et Ménard.

comme déchiquetés, laissant entre elles des intervalles de peau saine. Par la couleur et la forme, mais avec des dimensions très agrandies, ces taches rappellent celles de la rougeole, elles s'accompagnent au toucher d'une légère saillie en même temps que d'une augmentation assez marquée de la consistance du derme. Sur le côté gauche, l'éruption présente un aspect sensiblement différent, elle est constituée par de grandes plaques rouges à contours irréguliers, beaucoup plus larges que les taches du côté droit. Quelques-unes de ces plaques dans leur plus grand diamètre n'ont pas moins d'une douzaine de centimètres. Toutes ces plaques font une saillie très appréciable et s'accompagnent d'une infiltration du derme qui le rend bien plus épais et bien plus dur que d'ordinaire. Ce sont en réalité de larges élevures en forme de plateaux dont la surface est diversement colorée : elle est par places d'un rouge rosé et par places blanchâtre, mais d'un blanc plus accentué que la teinte normale de la peau rasée. L'ensemble de ces caractères montre que l'éruption consiste à la fois en un érythème et en une infiltration œdémateuse du derme, qu'il s'agit en un mot de véritables plaques ortiées, d'éléments éruptifs rappelant ceux de l'urticaire humaine et plus spécialement la variété désignée par les dermatologistes sous le nom d'urticaire géante. Cette éruption n'est apparente que dans les champs vaccinaux, là où la peau est rasée, mais elle existe ailleurs, masquée seulement par les poils, comme il est facile de s'en assurer en portant le rasoir en d'autres points : on découvre alors de nouvelles élevures en forme de plaques rouges, de tous points semblables aux premières avec lesquelles elles se continuent en partie, et il devient manifeste que l'éruption s'étend à toute la surface du tégument cutané.

Le 19 février, l'éruption persiste sous forme de taches rouges avec induration du derme, mais elles ne font plus à sa surface de saillie appréciable et ne forment plus d'élevures urticariennes. La température rectale de l'animal atteint 39°,5, celle de la génisse témoin 39° seulement.

Le 20 février, l'éruption persiste en se modifiant : aux taches congestives qui disparaissaient momentanément par la pression du doigt ont succédé en certains points des taches d'un rouge plus sombre, d'aspect hémorragique, que le doigt n'efface plus. L'infiltration du derme persiste également au point qu'elle rend difficile l'application des pinces à la base des vésicules vaccinales pour la récolte du vaccin, et l'empêche même absolument en nombre de points. Ces vésicules, un peu moins développées que chez la génisse témoin, ont d'ailleurs l'aspect normal. La température rectale atteint 39°,8 chez l'animal qui a reçu du sérum de cheval, 39°,2 seulement chez le témoin.

Le 21 février, l'éruption persiste encore, mais le derme est moins épaissi, moins dur ; les pustules qui la veille ne pouvaient être pincées à leur base pourraient l'être aujourd'hui. On excise, pour en faire l'examen histologique et bactériologique, un morceau de la peau du côté droit qui est le siège d'une tache érythémateuse très apparente avec infiltration marquée du derme. La température rectale atteint 40°, mais ne peut être comparée à celle du témoin qui, après la récolte du vaccin, a été conduit à l'abattoir. L'animal en expérience n'a d'ailleurs pas cessé de présenter un bon

état général, il a toujours bu et mangé comme ses voisins d'étable.

Le 22 février, l'éruption va s'atténuant et s'effaçant, la peau n'est plus sensiblement épaissie, les pustules vaccinales dont on n'a pas récolté le contenu sont fort belles. La température rectale est de 40°,2.

Le 24 février, l'éruption a presque complètement disparu : c'est à peine s'il en demeure quelques vestiges qui s'évanouissent les jours suivants. On prend quotidiennement la température de l'animal, mais il a défilé le pansement appliqué sur la peau dont un lambeau est excisé, les lèvres de la plaie sont enflammées, il en peut résulter de la fièvre, ce qui enlève toute valeur aux renseignements désormais fournis par le thermomètre, quant à l'action propre du sérum sur la température.

Le 2 mars, l'animal est conduit à l'abattoir, il pèse 111 kilogrammes et a donc augmenté de 2 kilogrammes pendant son séjour rue Ballu.

EXPÉRIENCE II. — Le 28 février 1896, une génisse pesant 132 kilogrammes et dont la température rectale marque 39°,3, est, dans l'après-midi, inoculée au côté droit, suivant le mode habituel, avec du vaccin éprouvé, puis reçoit sous la peau, en une seule injection, dans le fanon, à la base de l'encolure, 1,320 centimètres cubes de sérum de cheval, dose équivalente au centième de son poids. Ce sérum, comme celui de l'expérience précédente, nous a été fourni par M. Nocard qui l'a recueilli lui-même. Il provient d'un cheval qui d'une part, il y a quatre ans, a été inoculé à la peau avec du vaccin de génisse, qui d'autre part plus récemment a été immunisé contre la diphtérie, mais n'a cependant reçu aucune injection de toxine depuis le mois d'avril 1895. Une génisse témoin a été, dans la matinée du même jour, inoculée semblablement avec le même vaccin.

Le 29 février, la température rectale de l'animal en expérience atteint 40°,1; dans l'après-midi, il est inoculé au côté gauche avec le même vaccin qui la veille a servi à l'inoculation du côté droit.

Le 1^{er} mars, la température de l'animal en expérience atteint 40°,2.

Le 2 mars, il a encore 40°,1, le témoin présente seulement 39°,5.

Le 3 mars, la température descend à 39°,5, chez l'animal en expérience.

Le 4 mars, il n'a plus que 39°, mais on s'aperçoit qu'il marche avec peine et se tient d'ordinaire couché. Depuis le lendemain de l'injection, on a d'ailleurs remarqué qu'il cherchait à se dérober quand on l'approchait et surtout quand on le touchait, comme s'il eût eu de l'hyperesthésie.

Le 5 mars, la température reste normale à 39°, mais la gêne de la marche s'accroît. Les troubles locomoteurs prédominent dans le membre antérieur gauche qui ne sert plus à l'appui dans la station, et demeure constamment fléchi, au genou et au boulet. Cette attitude persiste pendant la marche, et c'est le boulet, non le sabot, qui touche le sol. C'est d'ailleurs à grand-peine qu'on fait sortir la génisse de l'étable et qu'on l'entraîne à faire quelques pas; il lui est très difficile de se tenir debout sans soutien, elle tomberait si elle n'était pas solidement maintenue. Cependant les articulations du membre malade ne semblent pas augmentées de volume, et la pression n'y révèle pas de points particulièrement douloureux. L'animal étant couché sur une table pour la récolte du vaccin, on observe d'abord que les pustules vaccinales présentent un aspect peu différent de l'aspect

normal, puis qu'il existe un véritable exanthème étendu à toute la surface cutanée, moins apparent seulement dans les régions couvertes de poils que dans les régions rasées, et constitué partout par des taches rosées très inégales, très irrégulières, de formes et à contours mal délimités. Sur le fond rosé de ces taches font saillie des élevures urticariennes de coloration blanche. Le derme au palper semble très épaissi. L'application des pinces à la base des pustules pour la récolte du vaccin est en certains points impossible, partout très difficile, et l'empreinte profonde qui subsiste après que les pinces sont retirées témoigne du degré très accentué de l'infiltration œdémateuse de la peau.

Le 6 mars, la température rectale marque 39°3. L'animal demeure couché et on le détermine difficilement à se lever. Toutefois il se tient et marche beaucoup mieux que la veille, puisque de nouveau le membre antérieur gauche sert à l'appui; la démarche reste seulement incertaine, quelque peu titubante même du train de derrière, et l'animal écarte les jambes plus que d'ordinaire, de façon à élargir la base de sustentation. On le sonde et l'urine traitée par la chaleur et par l'acide nitrique ne paraît pas contenir d'albumine. L'appétit a toujours été conservé. L'exanthème pâlit et s'efface.

Les troubles de la marche s'atténuent et disparaissent les jours suivants.

Le 9 mars, la génisse est conduite à l'abattoir et égorgée; on ampute aussitôt le segment inférieur du membre antérieur gauche pour faire l'examen des articulations du genou et du boulet.

EXPÉRIENCE III. — Le 27 mars 1896, une génisse pesant 120 kilogrammes reçoit en trois injections sous-cutanées à la base de l'encolure, à la région sternale et à la région mammaire, la quantité totale de 1,200 centimètres cubes de sérum de cheval équivalente au centième de son poids. Ce sérum provient d'une saignée faite par M. Nocard à un cheval âgé de 4 ans, employé à un service actif dans une grande administration, d'une santé parfaite et qui n'a pas subi d'autres essais expérimentaux que le suivant : il a reçu, il y a trois mois, en injection intra-veineuse, deux centimètres cubes d'une dilution de virus variolique préparée par M. Chauveau.

C'est seulement 24 heures après l'injection de sérum que la génisse est inoculée aux deux côtés avec du vaccin éprouvé, en même temps qu'une génisse témoin.

Le 1^{er} avril, dans la matinée, la génisse qui a reçu du sérum de cheval présente un exanthème d'un rouge vif, apparent surtout à la partie supérieure des champs vaccinaux. Le soir, la rougeur s'accuse et s'étend. La peau est épaissie au niveau des placards érythémateux, et à sa surface font saillie des élevures disséminées, plus nombreuses dans chaque champ vaccinal à sa partie tout à fait inférieure. La température rectale de l'animal atteint 39°8, tandis que celle du témoin est de 39°4.

Le 2 avril, l'exanthème généralisé est apparent non seulement à la surface des régions rasées, mais partout où la peau est naturellement dépourvue de poils, en particulier au pourtour des ouvertures palpébrales. La température se maintient à 39°8, celle du témoin ne dépasse pas 39°.

Le 3 avril, l'exanthème présente l'aspect suivant : les deux champs vaccinaux ont dans toute leur étendue une teinte rosée sur laquelle tran-

chent de nombreuses taches d'un rouge sombre, de dimensions inégales et de formes irrégulières, qui offrent à l'œil et au doigt une saillie très appréciable. La teinte rosée du tégument cutané s'étend à toute sa surface, elle est seulement masquée par les poils, mais on la découvre en les écartant, et elle se montre très apparente dans les régions dépourvues de poils, sur les mamelles, sur les trayons et au pourtour des orifices naturels, des yeux, des naseaux, de la vulve et de l'anus. La peau est épaissie, œdématiée, la pression du doigt y laisse une empreinte durable. Du pli qu'y a fait l'application d'une pince on voit, après érosion de l'épiderme, sourdre et s'écouler un liquide rosé, ce qui n'a pas lieu sur le témoin.

La peau est plus chaude au toucher des taches rouges que dans les régions où elle est faiblement teintée, il existe manifestement en dehors de la fièvre constatée au thermomètre une élévation de la température locale. Quand on mouille la peau avec de l'eau, on avive étonnamment la couleur et le relief de l'exanthème urticarien. L'eau chaude produit ce résultat immédiatement; l'eau froide fait d'abord pâlir la peau, puis à cette action vaso-constrictive succède un état de vaso-dilatation très accentué et persistant, la surface de la peau devient alors très inégale, et sur le fonds d'exanthème les plaques orliées ressortent en vive saillie. La pression avec un corps dur tel qu'un crayon agit d'abord comme l'eau froide, puis la peau rougit et se soulève sur le tracé du crayon comme il advient chez l'homme dans les cas de *dermographisme*. L'appareil locomoteur paraît indemne. De l'éruption vaccinale il est inutile de rien dire ici, si ce n'est qu'elle est relativement peu modifiée.

L'exanthème dû au sérum va s'atténuant et s'effaçant dans les jours qui suivent; il a disparu le 9 avril quand la génisse est conduite à l'abattoir.

Nous avons toutes raisons de croire que le sérum de cheval employé dans les trois expériences précédentes était absolument stérile, puisque M. Nocard l'avait recueilli et préparé lui-même. Un échantillon de chaque sérum n'en fut pas moins soigneusement examiné, dans le laboratoire de M. le Dr Chantemesse, par son préparateur M. d'Avellar qui l'enseménça vainement sur les différents milieux liquides et solides propres à la culture des microbes. Après huit jours d'étuve, tous ces ensemencements étaient demeurés stériles.

M. d'Avellar voulut bien aussi pratiquer l'examen histologique et bactériologique du lambeau de peau excisé, en pleine efflorescence de l'exanthème, à notre première génisse, ainsi que des deux jointures du membre malade appartenant au second de nos sujets d'expérience. Les pièces durcies par le sublimé acétique furent colorées par les diverses méthodes employées pour la recherche des micro-organismes, mais M. d'Avellar n'y put découvrir la présence d'aucun microbe. « Au point de vue

histologique pur, » nous citons la note qu'il a eu l'obligeance de nous remettre, » les colorations par le picro-carmin, l'héματοxyline ne montrent rien d'anormal. Il n'y a ni prolifération des noyaux ni agglomération des leucocytes indiquant un processus inflammatoire quelconque. Cependant on ne peut rigoureusement rien affirmer, les pièces ayant été plutôt préparées pour l'examen bactériologique dans le sublimé acétique qui a gonflé le tissu conjonctif. »

Il convient de retenir que ni dans le sérum injecté ni dans les lésions cutanées, ni dans les lésions articulaires, aucun microbe n'a été découvert.

EXPÉRIENCE IV. — Le 2 février 1896, une génisse pesant 112 kilogrammes reçoit en trois injections successives sous la peau du cou la quantité, exactement équivalente au centième de son poids, de 1,120 c. c. de sérum d'âne. Ce sérum provient d'une ânesse de 7 mois, il a été recueilli par M. Nocard qui l'a mis obligeamment à notre disposition. La génisse, vaccinée aussitôt après, montre dans les délais habituels une éruption vaccinale régulière, et ne présente à la suite de l'injection de sérum aucun trouble appréciable.

EXPÉRIENCE V. — Le 20 mars 1896, une génisse pesant 114 kilogrammes reçoit en quatre injections successives sous la peau du cou et de l'abdomen la quantité, exactement équivalente au centième de son poids, de 1,140 centimètres cubes de sérum d'âne. Ce sérum recueilli par M. Nocard provient de la même ânesse que celui de l'expérience précédente, mais dans l'intervalle des deux saignées qui lui ont été faites, 28 jours avant la seconde, l'animal a été vacciné avec succès par 132 incisions; le sérum injecté cette fois est donc du sérum d'ânesse vaccinée.

La génisse qui l'a reçu est aussitôt après inoculée avec du vaccin éprouvé et, comme le résultat de nos recherches antérieures permettait de le prévoir, l'éruption vaccinale qui succède à ces inoculations est notablement modifiée. Mais la génisse, comme celle de l'expérience précédente, ne présente à la suite des injections de sérum d'âne aucun trouble appréciable.

Tels sont les faits que nous avons d'abord observés. En les communiquant au Congrès de médecine de Nancy¹, nous avons dit qu'ils nous paraissaient démontrer l'action nocive pour la génisse du sérum de cheval. A l'appui de notre opinion nous invoquions les arguments suivants. Comment attribuer à une autre cause qu'à ce sérum les accidents observés? Jamais sur les milliers de génisses vaccinées à l'établissement de la rue Ballu on n'a vu pareille chose; des treize animaux auxquels nous avons injecté du sérum de génisse, à peu près en même temps

1. Congrès français de médecine, 3^e section, Nancy, séance du 6 août 1896.

que nous leur inoculions de la lymphé vaccinale, aucun n'a rien présenté de semblable; enfin les deux génisses vaccinées qui ont reçu du sérum d'âne n'en ont éprouvé non plus aucun trouble. Il y a là quelque chose de tout à fait spécial au sérum de cheval. D'autre part il semble bien que les accidents consécutifs à l'injection de ce sérum n'ont rien à voir avec l'inoculation vaccinale concomitante. C'est dans les jours qui suivent immédiatement l'injection que survient la fièvre, pendant la période d'incubation de la vaccine inoculée. L'exanthème, les arthropathies se montrent un peu plus tard, mais dans un assez court délai; ils sont manifestes après quatre jours, c'est-à-dire au moment où les vésicules vaccinales commencent seulement à apparaître, à l'inverse des éruptions observées parfois chez l'enfant vacciné qui ne surviennent qu'après la suppuration des pustules. Enfin il est impossible de n'être pas frappé de la très grande analogie de ces accidents avec ceux qui, dans l'espèce humaine, suivent parfois l'injection sous-cutanée des divers sérums thérapeutiques, et en particulier de leur étroite ressemblance avec l'urticaire, l'érythème morbilliforme et les arthropathies que l'emploi de plus en plus répandu du sérum antidiphthérique a fait connaître à la plupart des médecins comme les inconvénients de cette admirable médication.

Nous reconnaissons cependant que nos expériences auraient été plus probantes si les génisses auxquelles était injecté le sérum n'avaient pas en même temps été inoculées avec du vaccin.

C'est pourquoi, plus récemment, nous avons de nouveau recherché l'effet d'une injection de sérum de cheval sous la peau d'une génisse parfaitement saine, en nous plaçant cette fois en dehors de toute inoculation vaccinale ou autre. Dans ces nouvelles conditions, le résultat observé a été identiquement le même que dans les trois cas précédents, du moins en ce qui concerne les accidents cutanés, à savoir l'apparition, quatre jours après l'injection de sérum, d'un exanthème généralisé qui a persisté trois jours, simulant à la fois l'urticaire et la rougeole.

EXPÉRIENCE VI. — Le 18 septembre 1896, dans l'après-midi, une génisse pesant 413 kilogrammes, et qui n'a subi aucune inoculation, reçoit en deux injections sous-cutanées dans le fanon, à la base de l'encolure, 904 c. c.

de sérum de cheval, dose équivalente au 125^e de son poids. Ce sérum a été recueilli par M. Nocard. Il provient d'un cheval de 18 ans, en parfait état de santé, appartenant à M. Humbert, médecin vétérinaire de l'armée. Les seuls antécédents morbides de ce cheval ont été la gourme et une pneumonie à l'âge de 5 ans; son propriétaire, qui le possède depuis 12 ans, lui reconnaît une vigueur et une résistances extraordinaires, et ne l'a pas vu, pendant ce long espace de temps, indisponible un seul jour; il n'a jamais servi à aucune expérience. Après l'injection du sérum, on rase les poils de la génisse sur les deux côtés du tronc et du périnée, de façon à faciliter l'inspection des téguments et à permettre de voir, dès leur apparition, les accidents éruptifs, s'il en survient; puis on tient l'animal à l'abri de toutes les contaminations dans une étable isolée où, deux fois par jour, le matin et le soir, on vient l'examiner et prendre la température rectale. Cette température, immédiatement avant l'injection du sérum, atteignait 39° 4. Elle varie peu les jours suivants :

Le 19 septembre,	à 8 h. du matin	T. R. = 39° 3;	à 4 h. du soir	T. R. = 39° 3
Le 20	—	T. R. = 39° 5;	—	T. R. = 39° 4
Le 21	—	T. R. = 39° 2;	—	T. R. = 39° 3
Le 22	—	T. R. = 39° 3;	—	T. R. = 39° 2

Jusqu'au 22 septembre, on n'aperçoit aucune trace d'éruption, mais à cette date, dans l'après-midi, après quatre jours écoulés depuis l'injection du sérum, les deux côtés du tronc, principalement le gauche, surtout à sa partie supérieure, présentent une coloration rosée très manifeste, sur laquelle tranchent des taches à contours mal délimités, d'une teinte plus blanche que celle de la peau normale : c'est le début de l'exanthème.

Le 23 septembre, à 8 h. du matin, T. R. = 39° 4; à 4 h. du soir, T. R. = 39° 7

Le matin, on trouve que l'exanthème, plus apparent que la veille, a changé d'aspect.

La teinte rosée presque uniformément étendue sur la peau, sauf au niveau des plaques blanches, a fait place à une éruption qui rappelle, à première vue, celle de la rougeole dite boutonneuse. Elle est en effet constituée par des taches assez petites mais fort nombreuses, séparées par des intervalles de peau saine, et formant à l'œil et au doigt des saillies très appréciables. Cette éruption est généralisée, elle est très manifeste sur les surfaces rasées, au périnée et sur les deux côtés du tronc.

À quatre heures de l'après-midi, l'exanthème persiste, toujours plus apparent du côté gauche, surtout à sa partie supérieure, et quelque peu modifié. Il ne rappelle plus la rougeole boutonneuse; les taches rosées qui le constituent se sont agrandies au point de se toucher par leurs bords et même de se confondre en beaucoup d'endroits; leurs dimensions sont inégales, leurs contours irréguliers et mal délimités; elles sont saillantes et s'accompagnent d'un épaissement très apparent du derme, ou plus exactement d'une infiltration œdémateuse dont il est facile de constater l'existence et de mesurer le degré en saisissant alternativement entre deux doigts un pli de la peau dans une région érythémateuse et un pli de peau saine.

Le 24 septembre, à 8 h. du matin, T. R. = 39°; à 4 h. du soir, T. R. = 39° 6.

Le matin, l'éruption commence à pâlir sur le côté gauche où elle est

apparue d'abord, elle est au contraire plus manifeste sur le côté droit et au périnée. Pour la mieux examiner, on couche l'animal sur une table. Dans cette position, la peau du flanc droit qui est à découvert, au lieu de présenter une surface lisse et mince, se montre toute mamelonnée et comme hérissée d'élevures roses dont les unes, isolées et entourées de peau saine, présentent des formes diverses, rondes, ovales, irrégulières, tandis que les autres, se touchant et se confondant par leurs bords avec les élevures voisines, forment des plateaux saillants à contours capricieusement découpés comme ceux des cartes de géographie. Ces élevures sont surtout nombreuses à la partie supérieure du côté; plus rares dans la partie inférieure, elles font place à de petites taches à peine saillantes et véritablement morbilliformes. Des taches semblables sont disséminées sur les tétines, dans leur voisinage, au pourtour de l'anus, de la vulve, et sur toute la surface du périnée.

Le soir, à 4 heures, l'éruption est moins saillante et présente une teinte moins vive que le matin.

Le 25 septembre, à 8 h. du matin, T. R. = 39°; à 4 h. du soir, T. R. = 39°9. L'éruption pâlit et s'efface.

Le 26 septembre, à 8 h. du matin, T. R. = 38°4; à 4 h. du soir, T. R. = 39°3. L'éruption est en voie de disparition.

Le 27 septembre à 8 heures du matin, T. R. = 39°4.

La génisse est de nouveau pesée, elle a augmenté en neuf jours de 4 kilogrammes. On l'amène rue Ballu pour la vacciner. Quand elle est couchée sur la table, on aperçoit encore au périnée quelques macules d'un rose fané, comme celles de la rougeole à son déclin : c'est tout ce qui persiste de l'éruption provoquée par le sérum.

Le résultat de l'expérience précédente est la preuve que les accidents présentés par les quatre génisses auxquelles nous avons injecté du sérum de cheval dépendaient de cette injection à l'exclusion de toute autre cause.

Aussi pouvons-nous affirmer que le sérum de cheval injecté à nos génisses contenait des substances nuisibles pour l'espèce bovine. Ce sérum était exempt de microbes; les tissus de la peau et des jointures où siégèrent les troubles fonctionnels et les lésions congestives décrits plus haut en étaient également exempts : du moins un examen attentif n'y révéla la présence d'aucun micro-organisme. Les substances nuisibles en question étaient donc des substances toxiques, des matières solubles. Appartenaient-elles en propre et normalement à l'organisme du cheval ou, réserve faite pour ses aliments, lui avaient-elles été artificiellement apportées du dehors ? La réponse à cette question ne nous semble guère douteuse. Un seul des quatre chevaux avait été immunisé contre la diphtérie, encore n'avait-il pas

reçu de toxine depuis plus de dix mois; un autre avait reçu trois mois auparavant une injection intra-veineuse de deux centimètres cubes de virus variolique dilué; au troisième, on n'avait injecté ni toxine diphtérique ni virus variolique; enfin le quatrième n'avait jamais servi à aucune expérience, et depuis douze ans qu'il appartient au même propriétaire, observateur compétent et attentif, il n'avait pas été malade un seul jour. Or le sérum des quatre chevaux provoqua des éruptions presque identiques. Force est bien de conclure que le sérum de cheval peut contenir normalement des substances toxiques, dans une certaine mesure, pour l'espèce bovine: à ces substances, il convient d'attribuer la production, nous ne savons d'ailleurs par quel mécanisme pathogénique, des accidents que nous avons décrits.

Les résultats de nos recherches sur la gémisse sont à rapprocher des observations faites chez l'enfant par divers médecins. Le docteur Bertin¹ a traité des enfants diphtériques par des injections de sérum de cheval non immunisé: dans plusieurs cas, les malades ont présenté, sept jours après l'injection, une éruption d'urticaire très nette. Le docteur Sevestre² a fait à quatre enfants atteints d'angine non diphtérique des injections de sérum de cheval non immunisé, donné par M. Nocard; dans les quelques heures qui suivaient l'injection, il a observé une légère réaction fébrile, et deux des enfants traités ont présenté des éruptions analogues à celles que provoque parfois le sérum antidiphtérique. Enfin, le docteur A. Johansen³ a fait des injections de sérum de Roux et des injections de sérum de cheval non immunisé à deux séries d'enfants malades, atteints d'affections non diphtériques, et, dans les deux séries, il a observé les mêmes accidents que chez les diphtériques traités par le sérum immunisant: érythèmes, arthralgies, douleurs diffuses et souvent élévation de température.

Tous ces faits expérimentaux concourent à montrer que le sérum de cheval peut contenir des substances toxiques à la fois

1. BERTIN, Traitement de la diphtérie par le sérum de cheval non immunisé. *Gazette médicale de Nantes*, n° 4. — 1895.

2. SEVESTRE, Notes sur quelques injections de sérum de cheval non immunisé. *Société médicale des hôpitaux de Paris*. Séance du 29 mars 1895.

3. Cité par le docteur Hutinel dans sa communication à la Société médicale des hôpitaux de Paris, dans sa séance du 7 février 1896, sur les accidents de la sérothérapie antidiphtérique.

pour l'espèce humaine et pour l'espèce bovine. Il convient, bien entendu, de prendre ici le mot *toxique* dans son acception la plus large et de lui donner sa moins grave signification.

Il y avait lieu de rechercher l'action de la chaleur sur ces substances toxiques. Dans ce but, nous avons formé deux parts du sérum provenant de la saignée copieuse faite, pour notre dernière expérience, au cheval de M. Humbert. Tandis qu'une portion injectée sous la peau d'une génisse, à la dose du 125^e de son poids, provoquait l'exanthème généralisé dont nous avons parlé, une autre portion du même sérum était d'abord chauffée pendant une heure trois quarts à 58°, puis injectée, à dose équivalente, sous la peau d'une seconde génisse sans provoquer chez cet animal, placé dans les mêmes conditions que le premier, aucun accident et en particulier aucune éruption cutanée.

EXPÉRIENCE VII. — Le 18 septembre 1896, c'est-à-dire le jour même où le sujet de l'expérience précédente vient de recevoir, en injections sous-cutanées, une quantité de sérum de cheval égale au 125^e de son poids, une autre génisse faisant partie, comme la première, d'un lot d'animaux de même race tout récemment arrivé du Limousin, et pesant 74 kilogrammes, reçoit en une seule injection dans le fanon, à la base de l'encolure, 592 c. c., c'est-à-dire une dose équivalente aussi au 125^e de son poids, du même sérum de cheval recueilli par M. Nocard. Le sérum injecté à cette seconde génisse, a été la veille chauffé pendant 1 h. 3/4 à 58°. A part cette différence, tout est semblable chez les deux animaux qui sont isolés dans la même étable où, soir et matin, on vient les visiter et prendre leur température. Pour la génisse en question, la température rectale atteint seulement 38°8 avant l'injection de sérum, elle varie peu les jours suivants :

Le 19 septembre, à 8 h. du matin T. R = 38°5, à 4 h. du soir T. R = 39°						
Le 20	—	—	—	T. R = 38°4,	—	— T. R = 38°7
Le 21	—	—	—	T. R = 38°3,	—	— T. R = 38°7
Le 22	—	—	—	T. R = 38°8,	—	— T. R = 38°6
Le 23	—	—	—	T. R = 38°6,	—	— T. R = 39°
Le 24	—	—	—	T. R = 38°7,	—	— T. R = 38°6
Le 25	—	—	—	T. R = 38°4.		

Les poils des deux côtés du tronc et du périnée ont été rasés de façon à permettre de découvrir les moindres traces d'exanthème. Rien n'apparaît cependant et, après sept jours d'attente, alors que l'éruption du témoin pâlit et s'efface, l'animal est amené rue Ballu pour y être vacciné.

Autant qu'on en peut juger par une seule expérience, il semble donc que la chaleur détruise ou tout au moins atténue les substances nocives contenues dans le sérum du cheval, et qu'il suffise de le porter quelque temps à 58° ou peut-être même à une

température moins élevée, pour éviter les accidents qu'il provoque habituellement chez la génisse. On voit immédiatement le parti qu'on pourrait tirer de cette constatation pour la prophylaxie des accidents post-sérothérapiques dans l'espèce humaine, à la condition toutefois que les sérums thérapeutiques ne perdent pas leur pouvoir curateur à la température qui détruit leurs propriétés nocives.

Pour conclure, dans la question encore controversée de l'étiologie des accidents post-sérothérapiques, nos recherches viennent à l'appui de l'opinion généralement adoptée : ces accidents ne sont pas dus aux toxines introduites dans l'organisme des animaux producteurs de sérum non plus qu'aux antitoxines qui en dérivent, mais au sérum même qui sert à celles-ci de véhicule.

On peut prévoir que les accidents post-sérothérapiques seront un jour évités, probablement par le chauffage des sérums : il est au moins légitime de l'espérer.

CONTRIBUTION A L'IMMUNISATION DES LAPINS

CONTRE

LE STAPHYLOCOQUE ET LE STREPTOCOQUE PYOGÈNES

PAR LE D^r HONORÉ VAN DE VELDE

(Travail de l'Institut de bactériologie de l'Université de Louvain.)

I

INTRODUCTION

S'il est une question digne entre toutes d'être approfondie, c'est assurément la création de l'état d'immunité chez les animaux.

Pour arriver à créer cet état, de nombreuses voies ont été suivies. On a injecté des *cultures vivantes*, on a injecté des *cultures mortes*, on a eu recours aux *produits sécrétés* par les microbes, produits que l'on administrait tantôt tels quels, tantôt après des manipulations variées.

Tous ces procédés ont réussi à produire chez les animaux un état réfractaire plus ou moins parfait. Mais si les expériences isolées ont été nombreuses, les recherches coordonnées, faites dans le but d'établir la voie la plus rationnelle, font presque complètement défaut. Aussi voit-on les savants tendre à un même but par des procédés divers, sans que l'on ait des notions bien précises sur leur valeur réciproque. Nous n'en voulons qu'un exemple : M. Roger¹ prépare le sérum antistreptococcique par injections de cultures chauffées à 110°; M. Marmorek² préfère les cultures vivantes aux cultures filtrées, et MM. Denys et Leclef³ sont arrivés à leur fin aussi bien avec les cultures vivantes qu'avec les toxines débarrassées de tout streptocoque.

Il est pourtant de la plus haute importance d'être fixé exactement sur les lois qui régissent la production de l'état réfractaire. Est-il nécessaire, pour créer cet état, d'injecter tous les

1. ROGER, Congrès de Bordeaux 1895.

2. MARMOREK, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895.

3. DENYS et LECLEF, *La Cellule*, t. XI, 1^{er} fascicule.

produits microbiens, et dans la négative, dans quelle catégorie des produits élaborés trouve-t-on les substances vaccinales? N'existe-t-il pas, à côté des substances utiles, des substances nuisibles, dont l'élimination rendrait l'immunisation plus rapide et plus complète?

Voilà autant de questions auxquelles on ne peut donner que des réponses bien insuffisantes, et sur lesquelles il importerait d'avoir des données scientifiques précises.

Nos recherches ont porté sur le staphylocoque pyogène et sur le streptocoque pyogène.

Nous avons été guidé dans ce double choix par les considérations suivantes : le staphylocoque pyogène sécrète un poison spécial, la leucocidine¹. Ce poison est un des facteurs dont le microbe se sert pour vaincre les animaux supérieurs.

Chez les lapins immunisés contre le staphylocoque, il se forme un contrepoison de cette toxine, une *antileucocidine*². La leucocidine et l'antileucocidine, grâce à leur action spéciale sur les globules blancs, peuvent être facilement décelées, et on peut les doser avec précision. Cette condition est favorable pour juger de la valeur des différents procédés de vaccination.

A côté du staphylocoque, nous avons choisi le streptocoque parce que, d'après les recherches de certains auteurs, on peut immuniser les animaux contre ce microbe par des procédés divers, qui ne laissent pas subsister dans le produit injecté les mêmes principes. Les uns emploient des cultures simplement filtrées ; les autres des cultures filtrées chauffées à de hautes températures. On peut, sans crainte de se tromper, affirmer que ces deux matériaux de vaccination n'ont pas la même composition, et il sera intéressant de fixer par des recherches comparatives quels sont ceux qui confèrent l'immunité la plus complète et la plus rapide.

Notre travail portera donc sur les immunisations contre le staphylocoque et le streptocoque pyogènes.

1. Dr HONORÉ VAN DE VELDE; Étude sur le mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène. *La Cellule*, t. X, 2^e fascicule.

2. J. DENYS et H. VAN DE VELDE, Sur la production d'une antileucocidine chez les lapins vaccinés contre le staphylocoque pyogène. *La Cellule*, t. XI, 2^e fascicule.

II

VACCINATION CONTRE LE STAPHYLOCOQUE PYOGÈNE

A. — *Historique et expériences préliminaires.* — La leucocidine que nous avons découverte dans les sécrétions du staphylocoque pyogène présente à notre avis le plus grand intérêt : c'est la seule toxine connue jusqu'à ce jour qui produise sur les tissus des altérations immédiatement décelables au microscope. Les leucocytes vivants en particulier se comportent vis-à-vis d'elle d'une façon très curieuse et des plus caractéristiques. Leur noyau devient visible, leur protoplasme se dissout, et le corps de la cellule n'est plus représenté que par une mince membrane contre laquelle est blotti le noyau. Examinés à la chambre chaude, les globules blancs sont totalement dépourvus de mouvements amiboïdes ; en un mot, ils sont tous frappés de mort. Il est facile de suivre les transformations que subit le globule blanc en passant de l'état de vie à cet état de dégénérescence. Pour cela, il suffit de provoquer chez un lapin un exsudat pleurétique par l'injection de staphylocoques virulents. A la mort de l'animal, l'examen d'une goutte de cet exsudat frais montre, à côté d'une culture de microbes, tous les leucocytes atteints de la dégénérescence caractéristique décrite plus haut. Cet exsudat est dépouillé de ses globules blancs par l'action centrifuge. On dépose une gouttelette du liquide ainsi obtenu sous un porte-objet, on y ajoute des globules blancs vivants provenant d'un exsudat obtenu par l'injection à un autre lapin d'une émulsion de staphylocoques stérilisée à 120°, on couvre rapidement d'un couvre-objet, et on examine la préparation dans la chambre chauffée de Zeiss.

Pendant les premières secondes, les leucocytes conservent leur aspect normal et poussent même des pseudopodes ; mais bientôt ceux-ci se rétractent, le globule reste immobile, tandis que dans son intérieur le protoplasme devient granuleux et que les anses du noyau se dessinent ; la membrane se boursouffle en même temps, tandis que le contenu granuleux se réfugie contre un des côtés de la membrane. Au bout d'un temps très court, tout le contenu de la cellule disparaît comme s'il se dissolvait dans le liquide environnant, et le leucocyte se trouve réduit à une vésicule distendue. Le noyau lui-même continue à s'altérer et finit

par ne se trouver représenté que par un point brillant. Toutes ces modifications se succèdent avec une étonnante rapidité : à partir du moment où le globule rétracte ses pseudopodes jusqu'à celui où il n'est plus représenté que par une vésicule, il ne se passe que quelques secondes. Nous avons également démontré qu'il n'est pas nécessaire d'employer l'exsudat pur, mais qu'on peut le diluer dans de fortes proportions avec de l'eau salée physiologique ou du sérum de lapin normal, sans que l'exsudat cesse d'exercer son action funeste sur les globules blancs.

Dans le travail cité plus haut, fait avec M. Denys, nous avons démontré qu'il y a des exsudats tellement riches en leucocidine, qu'ils supportent même des dilutions au 1/500, et même au 1/1000, sans perdre leur action délétère sur les globules blancs.

Quelle est la nature de cette dégénérescence? Il est certain qu'elle présente de l'analogie avec les modifications que manifestent les globules blancs quand on les place dans de l'eau pure; mais cette analogie n'est pas complète, le noyau subissant de la part de la leucocidine une dégénérescence qui n'est pas à comparer avec celle qu'on observe dans l'eau pure. Il n'est pas possible du reste que la désorganisation produite par la leucocidine soit due à un simple phénomène d'osmose. En effet, on ne trouve pas, dans un exsudat riche en sels, les conditions nécessaires pour faire gonfler et éclater un globule par ce processus physique.

Nous avons démontré¹ du reste que, chauffés pendant 10 minutes à 58°-60°, les exsudats les plus riches en matières destructives pour les globules blancs perdent cette propriété et deviennent au contraire d'excellents milieux de conservation.

Ces expériences démontrent nettement que la destruction du globule est due à la présence d'un poison de nature albuminoïde, un ferment, qui est détruit à une température relativement basse (58° à 60°).

Par l'exposé que nous venons de faire, il est donc établi que les staphylocoques produisent un poison spécial qui détruit les leucocytes. Or, dans des recherches récentes, faites avec M. Denys, nous avons prouvé qu'il se forme dans les lapins vaccinés une substance dont la présence a pour effet d'empêcher

1. Dr H. VAN DE VELDE, *Loco cit.*

la leucocidine d'exercer son action. Cette substance, à laquelle nous avons donné le nom d'*antileucocidine*, se trouve dissoute dans le sérum du sang.

Voici comment on démontre son existence. Supposons un milieu renfermant de la leucocidine; les leucocytes introduits dans ce milieu sont détruits après un temps très court; mais si, avant d'y introduire les globules blancs, on y ajoute un peu de sérum d'animaux vaccinés, les globules blancs restent intacts et continuent à se mouvoir comme s'ils se trouvaient dans un milieu tout à fait normal.

Il ne peut exister aucun doute sur le rôle important que l'*antileucocidine* joue dans l'immunisation du lapin contre le staphylocoque. En effet, empêchant la leucocidine de détruire le leucocyte, elle permet à ce dernier d'accomplir ses fonctions qui sont d'englober et de détruire les microbes. Or précisément ces fonctions jouent un rôle considérable dans la défense du lapin contre l'infection staphylococcique. Nous avons déjà réuni à l'appui de cette manière de voir différents faits intéressants. Nous avons notamment constaté que du sérum chauffé pendant une heure à 58° a perdu toute action bactéricide sur les staphylocoques; ceux-ci s'y développent comme dans un bouillon. Au contraire, si on y ajoute des globules blancs, la pullulation est non seulement entravée, mais les organismes diminuent dans des proportions considérables. Nous avons obtenu le même résultat en mettant les globules blancs dans du bouillon auquel, évidemment, on ne peut attribuer une action bactéricide. Enfin nous avons démontré qu'un exsudat complet, c'est-à-dire composé de sa partie liquide et des globules blancs, a des propriétés bactéricides beaucoup plus énergiques que l'exsudat dépourvu de ses globules blancs.

Toutes ces raisons militent assurément en faveur de l'opinion que les globules blancs interviennent pour une bonne part dans la défense du lapin contre le staphylocoque. Mais comme une partie de notre travail va précisément rouler sur la réalité de cette intervention, nous avons cru opportun d'apporter une nouvelle preuve de cette manière de voir.

Voici l'idée dont nous sommes parti :

Quand on fait agir un milieu composé de sérum et de leucocytes sur des microbes, on ne peut pas bien délimiter la part

qui revient aux globules blancs de celle qui est due au liquide. Aussi, si on se trouve dans la nécessité de préciser exactement le rôle qui revient aux leucocytes, il est de toute nécessité de supprimer celui du sérum.

Les expériences que nous avons instituées à ce sujet avec du sérum chauffé avaient certains inconvénients qui disparaissent dans notre procédé modifié :

Nous commençons par ensemençer les staphylocoques dans du sérum. Comme on le sait, cet ensemençement est suivi d'une période pendant laquelle le nombre des organismes diminue (action bactéricide du sérum). Au bout d'un certain nombre d'heures, la pullulation commence et marche alors sans interruption. Ce moment coïncide avec la disparition du pouvoir bactéricide et peut être noté facilement. Il suffit de faire de temps en temps un examen microscopique.

Dès qu'on trouve dans la préparation des staphylocoques groupés en petits amas, on peut être sûr que le sérum a perdu tout pouvoir bactéricide.

A ce moment, nous faisons une première plaque de gélose afin de déterminer le nombre de microbes renfermés dans une quantité déterminée de sérum (deux anses d'un fil de platine) ; puis nous divisons le sérum en deux portions. A l'une, nous ajoutons des globules blancs obtenus par une injection de staphylocoques morts dans la plèvre d'un lapin et séparés de la partie liquide de l'exsudat par l'action centrifuge. Cette portion présente à partir de l'addition des leucocytes une diminution considérable du nombre des microbes ; il arrive même que la plaque ne montre pas de colonies du tout. A l'autre portion, qui sert de témoin, nous ajoutons une trace de la partie liquide de l'exsudat. Cette sérosité, comme nous l'avons démontré, est extrêmement bactéricide, et on pourrait être tenté d'attribuer la diminution microbienne qui suit l'introduction des leucocytes, à la sérosité qui est restée adhérente à ces derniers. Le tube témoin, qui reçoit plus de sérosité qu'il n'en peut rester accolée aux globules, est précisément là pour démontrer que l'action destructive revient bien à ceux-ci.

EXPÉRIENCE I. — Globules blancs ajoutés à des cultures de staphylocoque pyogène dans du sérum après que la pullulation a commencé.

Nombre de colonies avant de dédoubler le tube.	Dédoublement et addition des globules blancs.	20 minutes après.	Une heure après.	1 h. 1/2 après.	2 h. 1/2 après.	5 heures après.	20 heures après.
2.125	Globules blancs.	420	0	0	0	0	4.293.300
	Trace de sérosité.	1.920	1.934	600	399	5.928	innom- brables.

EXPÉRIENCE II. — Cette deuxième expérience est triple et est faite sur le même plan que la précédente. Outre l'emploi de sang comme 3^e tube de culture, cette expérience a ceci de particulier qu'au moment de dédoubler les tubes et d'ajouter les globules blancs, la pullulation est déjà très avancée. Des examens répétés ont permis de constater que les globules blancs possédaient de très bons mouvements sept heures après l'addition.

NATURE des CULTURES	Plaque immédiatement avant de dédoubler les tubes.	Dédoublement et addition des globules blancs.	23 minutes après.	1 heure après.	2 heures après.	3 heures après.	5 heures après.	7 heures après.	18 heures après.
I. Sérum..	23.224	+ sérosité.	30.080	8.400	3.360	300	1.740	280.000	inn.
		+ glob. bl.	11.440	2.240	1.000	290	0	0	4.440
II. Sérum..	14.520	+ sérosité.	19.260	14.000	21.840	41.280	255.200	492.000	inn.
		+ glob. bl.	11.600	3.080	3.240	100	480	480	19.000
III. Sang...	201.600	+ sérosité.	159.040	278.400	988.600	1.536.000	inn.		
		+ glob. bl.	32.480	7.392	10.584	2.430	6.500	2.700	29.400

EXPÉRIENCE III. — Elle est double. Cultures dans le sang.

Plaques immédiatement après ensemencement de Staph. virul.	Plaques au moment de dédoubler.	Addition des globules.	20 minutes après addition des globules (t. du laboratoire).	1 h. 20 après (t. de l'éuve).	2 heures après.	3 heures après.	4 h. 1/2 après.	6 heures après.	8 heures après.	12 heures après.	20 heures après.	30 heures après.
7.360	120.000	+ sérosité	183.040	241.280	736.000	1.520.000	inn.					
		+ globul.	36.920	2.640	4.032	8.280	4.890	6.328	3.720	10.080	93.600	570.000
12.480	104.640	+ sérosité	172.480	216.960	643.120	1.484.800	inn.					
		+ globul.	58.752	6.720	7.448	4.446	7.840	6.720	4.480	4.400	33.840	25.004

Après 30 heures, la plupart des globules des tubes 2 et 4 poussaient encore de beaux pseudopodes.

Nous avons tenu à rapporter ces quelques expériences afin de mettre hors de doute l'intervention de la phagocytose dans le conflit du lapin avec les staphylocoques.

Il était absolument nécessaire de bien établir l'importance de ce phénomène, car nos recherches ont précisément pour but d'examiner dans quelles conditions se produit l'antileucocidine, dont le rôle consiste à neutraliser les effets funestes de la leucocidine.

Ce point fixé, nous arrivons à nos expériences de vaccination proprement dites.

B. — *Vaccination de lapins au moyen de produits chauffés et non chauffés.* — Comme moyen vaccinant, nous nous sommes servi cette fois d'exsudats pleurétiques obtenus en quantité assez notable par l'injection de tout un lot de lapins avec des cultures de staphylocoques virulents. A la mort de ces lapins, les exsudats ont été recueillis avec des pipettes stérilisées, puis examinés à frais sous le microscope, pour voir l'état des globules blancs : ceux-ci, dans tous les exsudats, présentaient la dégénérescence caractéristique, preuve de l'existence de la leucocidine. Ces divers exsudats ont été mélangés pour fournir un liquide de vaccination toujours identique à lui-même ; dilué dans plusieurs

fois son volume d'eau physiologique ou de sérum normal, ce mélange était encore capable de détruire les globules blancs en quelques instants. Pour tuer les microbes, nous avons ajouté à ce liquide une petite quantité d'éther sulfurique. Après cette addition, les ensemencements répétés sur gélose n'ont donné lieu à aucun développement. Ce dernier procédé de stérilisation a, sur le chauffage, l'avantage de respecter les substances détruites par des températures relativement basses, telles que la leucocidine qu'il importait de conserver dans notre liquide vaccinal. On démontre facilement que l'éther n'altère pas la leucocidine. En effet, si, à un exsudat de force leucocidique connue, on ajoute un peu d'éther et qu'après quelques jours on détermine la puissance destructive de cet exsudat, on trouve qu'elle n'a pas diminué. Il est bien entendu que, pour faire ce second essai, il est nécessaire d'exposer, pendant quelque temps, le liquide à l'air en couche mince, afin de permettre l'évaporation de l'éther qui, par lui-même, serait nuisible aux leucocytes. Si, pendant cette exposition, le liquide s'est un peu concentré, on le ramène à son volume primitif au moyen d'un peu d'eau distillée.

Comme nous l'avons dit plus haut, notre but était de savoir si l'on pouvait obtenir l'antileucocidine aussi bien avec un produit renfermant la leucocidine qu'avec un produit où cette dernière avait été détruite.

Pour obtenir un produit libre de leucocidine, nous avons chauffé pendant une demi-heure à 60° une partie de l'exsudat. De cette façon, comme nous avons pu à maintes reprises nous en convaincre, toute trace de leucocidine disparaît. *Avec ces deux produits, nous avons vacciné deux séries de lapins.*

Aux lapins de la première série, nous donnons l'exsudat non chauffé; à ceux de la seconde, nous injectons l'exsudat préalablement chauffé.

Les premières doses furent très petites et ce n'est que peu à peu qu'elles furent augmentées. Les différents lapins, d'un poids moyen de 2,250 grammes, reçurent chacun sous la peau du dos, en une dizaine d'injections, environ 3,75 c. c. d'exsudat non dilué d'une force antileucocidique telle, qu'un volume dilué dans 10 volumes de sérum normal pouvait encore détruire rapidement les globules blancs.

Pour les premières injections, nous avons dilué les exsudats

dans la suite, nous en sommes arrivé à injecter l'exsudat tel quel. Au début, nous avons remarqué que l'injection, même de très petites quantités (0,04 c. c.), était en général suivie d'une perte de poids chez nos lapins. Dans ce cas, nous avons attendu jusqu'à ce qu'ils eussent regagné leur poids primitif. Ces diminutions de poids ne s'observent qu'au commencement de l'immunisation; dans la suite, quoique les doses deviennent de plus en plus fortes (0,4 c. c., 0,5 c. c., 2 c. c.), elles ne se font plus remarquer. Il se crée chez les animaux une vraie tolérance dont nous avons pu constater plus d'une fois la réalité. C'est ainsi qu'arrivés à faire supporter à nos lapins vaccinés une dose de 2 c. c. d'exsudat pur, nous avons injecté en même temps à deux lapins neufs, du même poids, la même dose. Tandis que les premiers ont conservé leur poids, les lapins neufs ont subi une diminution graduelle comme le montre le petit tableau suivant :

Lapins neufs.	1 ^{er} jour.	2 ^e jour.	3 ^e jour.	4 ^e jour.	5 ^e jour.	6 ^e jour.
Exsudat chauffé	2.200	2.020	1.900	1.960	1.900	1.750
Exsudat non chauffé..	2.200	2.000	1.940	2.000	1.950	1.840

Après 7 à 8 semaines de vaccination, nous avons cru le moment venu de rechercher si le sang ne renfermait pas d'antileucocidine. Dans ce but, nous avons soutiré aux animaux vaccinés, par la veine jugulaire, de petites quantités de sang. Le sérum a été séparé, tantôt par l'action centrifuge, tantôt par l'expression du caillot.

Nous avons obtenu des résultats complètement différents suivant que nous avons examiné du sérum des lapins immunisés au moyen de l'exsudat *non chauffé*, et celui des lapins vaccinés avec l'exsudat *chauffé*.

Le sérum des premiers, c'est-à-dire de ceux injectés avec le produit non chauffé, renferme de l'antileucocidine : aucun lapin injecté de cette façon ne fait exception à la règle. Par le dosage, on peut s'assurer que la quantité d'antitoxine est notable.

L'expérience suivante est un exemple de ce dosage. La première colonne surmontée de la lettre S indique la quantité de sérum de lapin vacciné; la deuxième colonne surmontée de la lettre L, les différentes quantités d'exsudat leucocidique mises en présence du sérum à éprouver; la troisième colonne relate l'effet sur les leucocytes. Elle démontre qu'un volume de sérum anti-leucocidique est capable de neutraliser complètement deux volumes d'exsudat à leucocidine.

S	+	L	
1 partie.	1 partie.		Les globules blancs restent vivants (observés pendant 45 minutes).
—	2 parties.		Les globules blancs restent vivants (observés pendant 45 minutes).
—	3 parties.		Les globules montrent de beaux mouvements; après 7 minutes, quelques-uns montrent leurs noyaux; après 10 minutes, la dégénérescence est achevée.
—	4 parties.		Les globules commencent à subir la dégénérescence après 3 minutes; après 4 minutes, elle est achevée.
—	5 parties.		Les globules sont détruits après 1 m. 1/2.
—	6 parties.		Les globules sont détruits après 1 m. 1/2.

Contrairement aux lapins inoculés avec l'exsudat non chauffé, ceux qui ont reçu l'exsudat chauffé se comportent comme des lapins ordinaires; leur sérum est incapable de neutraliser la leucocidine. Il est vrai que si l'on fait agir de grandes quantités de ce sérum sur une petite quantité d'exsudat, on voit l'action délétère de ce dernier s'atténuer et disparaître; mais on obtient le même effet avec le sérum des animaux qui n'ont été soumis à aucune injection. Comme nous l'avons exposé dans un de nos travaux précédents, l'action du sérum de ces animaux ne paraît pas spécifique, mais semble due uniquement à la forte dilution du poison, puisque la leucocidine devient inactive quand elle est diluée au même degré dans l'eau physiologique.

Dans le tableau suivant nous mettons en regard les résultats obtenus avec deux lapins témoins et un lapin vacciné au moyen

de l'exsudat chauffé. La quantité d'exsudat leucocidique (L) reste constante, la quantité de sérum (S) va en croissant. En moyenne les altérations des globules blancs se font aussi facilement dans le sérum du lapin traité que dans le sérum des lapins témoins.

L + S	1 ^{er} lapin témoin.	2 ^e lapin témoin.	Lapin vacciné avec des produits chauffés
1 p. 1 p.	Globules détruits en 1 m. 1/2.	Globules détruits en 1 m. 1/2.	Globules détruits en 1 m. 1/2.
1 p. 5 p.	Globules détruits en 1 m. 1/2.	Globules détruits en 1 m. 1/2.	Globules détruits en 1 m. 1/2.
1 p. 10 p.	Globules détruits en 1 m. 1/2.	Globules détruits en 3 minutes.	Globules détruits en 1 m. 1/2.
1 p. 15 p.	Globules détruits en 3 minutes.	Globules détruits en 5 minutes.	Globules détruits en 4 minutes.
1 p. 47 p.	Mouvements pendant 5 minutes; la destruction commence après 6 minutes et s'achève en 1 minute.	Globules vivants après 10 minutes.	Les globules subissent un commencement de dégénérescence, seulement après 40 minutes.
1 p. 20 p.	Les globules restent vivants (observés 1/4 d'heure).		Globules restent vivants.

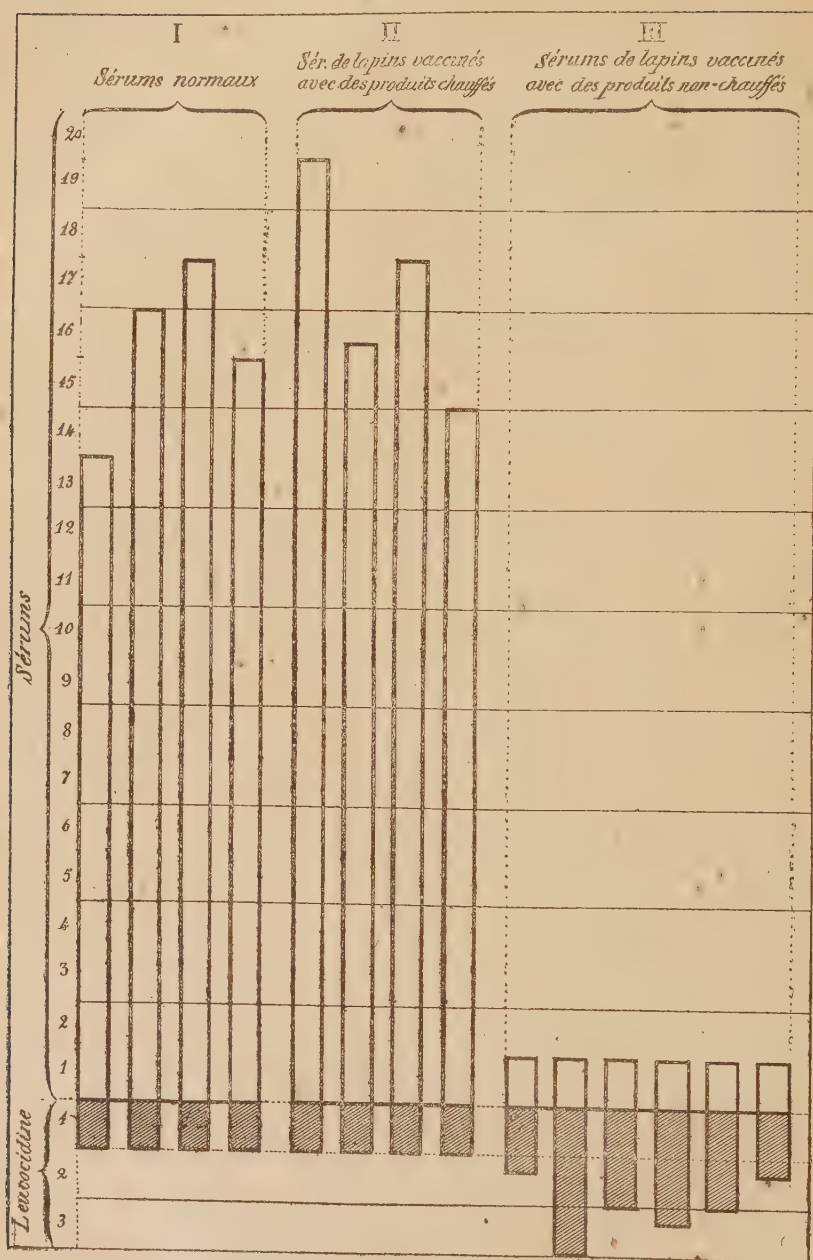
Nous avons opéré ces dosages sur un certain nombre de lapins. Nous en avons résumé les résultats dans la figure de la page suivante.

La partie non ombrée indique le sérum; la partie ombrée l'exsudat leucocidique. Les chiffres indiquent les unités de volume.

D'après la longueur relative des deux parties, on peut juger de la quantité nécessaire pour que l'exsudat et le sérum se neutralisent.

La planche comprend 3 groupes.

* Le premier est composé de 4 lapins normaux; le second de 4 lapins vaccinés avec des produits chauffés. Dans ces deux groupes, la quantité de sérum nécessaire pour contre-balancer une quantité fixe d'un exsudat à leucocidine oscille dans des limites étroites; mais quand on considère l'ensemble, elle est aussi



élevée pour les animaux vaccinés avec des produits *chauffés* que pour les animaux neufs.

Le 3^e groupe comprend les animaux vaccinés avec les produits *non chauffés*. Tandis que, dans les deux premiers, la leucocidine présente la petite quantité, ici c'est l'inverse. La façon dont le tableau a été tracé fait ressortir d'une façon frappante la différence entre les lapins vaccinés avec les deux espèces de produits.

III

VACCINATION CONTRE LE STREPTOCOQUE PYOGENE

Dans la première partie de notre travail, nous avons vu que pour produire chez le lapin l'antileucocidine, il est nécessaire d'injecter les produits de staphylocoques non chauffés. Si l'on en élimine par la chaleur le poison détruit à 58°, cette substance antileucocidique ne se produit plus.

Cette constatation est de nature à faire penser que pour obtenir une bonne vaccination contre un microbe, il faut recourir aux cultures complètes et non aux cultures chauffées.

Tirer une conclusion générale de ce fait isolé serait tomber dans une erreur profonde, comme le démontrent nos recherches sur la vaccination contre le streptocoque.

Nous avons déjà vu plus haut que cette vaccination a été obtenue par des procédés divers : injections de cultures vivantes, de cultures filtrées, de cultures chauffées. Les savants qui ont pratiqué ces vaccinations n'ont malheureusement pas comparé les effets obtenus par les divers procédés.

Voulant examiner la question de plus près, nous avons voulu chercher, par quelques expériences, si la vaccination des lapins contre le streptocoque est aussi rapide, avec les cultures filtrées *non chauffées*, qu'avec les mêmes cultures chauffées à 120°.

Une culture de streptocoques bien virulents a été filtrée à travers la porcelaine, puis divisée en 2 parts : l'une a été employée telle quelle, l'autre chauffée à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes. Ces deux produits ont servi pour toutes nos vaccinations.

Deux lots de lapins reçurent ces solutions à dose croissante. Les premières doses furent de 1 c. c. et s'élevèrent graduellement dans la suite jusqu'à 20 c. c. Les premières inoculations déterminèrent un amaigrissement aussi bien chez ceux qui reçurent

les toxines chauffées que chez ceux qui reçurent les toxines non chauffées. Dans le cours ultérieur de la vaccination, le poids se maintint sans diminution notable. Cette tolérance pour le poison n'était pas l'effet d'un affaiblissement de la toxine, car si on donnait à des lapins neufs ces hautes doses auxquelles étaient habitués les lapins vaccinés, elles produisaient un amaigrissement suivi de cachexie et de mort.

Après 2 mois, les lapins avaient reçu chacun en tout de 60 à 70 c. c. de toxine. Nous jugeâmes alors le moment venu pour comparer le degré d'immunité acquis. Nous avons procédé de la façon suivante :

Nous inoculâmes sous la peau de l'oreille, à un lapin de chaque lot, 1/10,000 c. c. d'une culture de streptocoques dans du bouillon, et qui avait séjourné 24 heures à l'étuve. La même dose fut donnée à un lapin témoin. Le lendemain, celui-ci présenta un érysipèle typique, tandis que les autres n'offraient aucun signe de réaction. Cette expérience nous apprit que les toxines chauffées comme les toxines non chauffées avaient conféré un *certain* degré d'immunité. Il restait à voir si l'immunité acquise était aussi forte pour l'un des lots que pour l'autre. Pour fixer ce point, nous injectâmes à un lapin de chaque groupe 1/500 de c. c.; à 2 autres (1 par groupe) 1/50 de c. c.; un lapin témoin reçut 1/1,000 de c. c. Après un jour d'inoculation, celui-ci présenta un érysipèle de l'oreille à marche typique et qui le fait périr en 3 jours. Aucun des 4 lapins vaccinés ne présenta la moindre inflammation à l'oreille.

Cette expérience, tout en indiquant que l'immunité dont jouissaient nos lapins était plus forte que ne l'indiquait la première expérience, ne répondait pourtant pas encore à notre but, qui était de rechercher si l'immunisation acquise était poussée aussi loin chez le premier lot de lapins que chez l'autre; il fallait donc encore donner des doses plus fortes. C'est alors que nous donnâmes aux lapins les doses suivantes très considérables : à 1 de chaque groupe 1/10 de c. c. de culture; à 2 autres (1 de chaque groupe) 1/4 de c. c. Ces doses sont considérables quand on songe que 1 10,000 de c. c. suffit pour donner un érysipèle.

Nos lapins se comportèrent comme suit :

Des 2 qui avaient reçu 1/10 de c. c., celui vacciné avec les *toxines non chauffées* présenta un érysipèle léger, qui n'envahit

pas même la moitié de l'oreille. L'autre, qui avait reçu les mêmes toxines, mais *chauffées*, ne présenta qu'une réaction locale.

Les 2 lapins qui avaient reçu les plus fortes doses (1/4 c. c.) présentèrent un érysipèle intense qui envahit toute l'oreille.

Le but que nous nous propositions était parfaitement atteint. En effet, par l'injection de hautes doses, nous avons fixé les limites de vaccination de nos lapins. Au moment où la vaccination fut interrompue, ils tolérèrent 1/300 et 1/50 de c. c., c'est-à-dire la dose 400 fois mortelle, mais aucun ne supporte la dose plus élevée : 1/10 et 1/4 de c. c.

Nous pouvons conclure de ces expériences que les toxines de streptocoques *chauffées* confèrent aux lapins une immunité au moins aussi grande que les produits *non chauffés*. Si nous devons tirer une conclusion de la façon dont se sont comportés les 2 lapins qui ont reçu 1/10 c. c., nous devrions même en déduire que les toxines chauffées ont vacciné plus que les toxines non chauffées. Mais nous ne voulons pas attacher importance à ce fait : l'expérience de tous les jours démontrant que, vis-à-vis d'une même dose de streptocoques, il peut y avoir de légères nuances dans la façon dont les lapins réagissent.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Résumant nos recherches sur la vaccination des lapins contre le streptocoque et le staphylocoque pyogènes, nous arrivons aux conclusions suivantes :

Si l'on veut renforcer la résistance du lapin contre le staphylocoque en accroissant son pouvoir antileucocidique, il est nécessaire de lui inoculer une substance qui se trouve dans les produits de sécrétion non chauffés et qui en disparaît à une température de 60°. Si l'on emploie le produit chauffé, l'accroissement du pouvoir antileucocidique ne s'obtient pas et les globules du lapin injecté ne sont pas mieux protégés contre la leucocidine que ceux du lapin neuf ¹.

Quel est le produit qui provoque la formation de l'antileucocidine ?

1. C'est par erreur que dans le mémoire sur la production d'une antileucocidine, cité plus haut, on a dit, page 361, que les cultures chauffées avaient la propriété de produire cette substance. Au lieu de « tuées par la chaleur », il faut lire « tuées par l'éther ».

Nous ne serions pas étonné que ce fût la leucocidine elle-même, mais nous ne pouvons en fournir la preuve, le chauffage pouvant avoir détruit d'autres substances que la leucocidine, substances qui précisément auraient pour action de produire l'antileucocidine. Nous basant sur la spécificité des antitoxines, nous inclinons pourtant à penser que la leucocidine joue dans cette production le rôle décisif.

Si une bonne vaccination du lapin contre le staphylocoque nécessite l'emploi des toxines non chauffées, il en est tout autrement de la vaccination contre le streptocoque. Ici, dans l'immunisation par les cultures filtrées, les produits chauffés à 120° se montrent aussi actifs que les produits non chauffés.

Ces données permettent d'affirmer que l'on ne pourra pas formuler de loi générale de vaccination. On arrivera sans doute à formuler des règles spéciales pour une immunisation donnée. De nombreuses recherches seront nécessaires pour fixer ces règles.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES LEVURES DE BIÈRE

PAR M. E. BOULLANGER.

(Travail du Laboratoire de fermentations à l'Institut agronomique.)

Les derniers travaux sur les levures ont révélé entre elles des différences dont l'étude est à l'ordre du jour des laboratoires et de l'industrie. C'est comme contribution à cette étude que j'apporte les résultats de l'examen comparatif de quelques-unes des levures existant dans les collections du laboratoire de fermentations de l'Institut national agronomique, levures que mon savant maître, M. Kayser, a bien voulu mettre à ma disposition.

J'ai commencé par éliminer celles qui pouvaient présenter entre elles quelque ressemblance, pour ne garder que celles qui étaient nettement différentes : à cet effet, j'aiensemencé seize de ces levures dans de l'eau de touraillons stérile et sucrée à 20 0/0 de saccharose. La fermentation a duré 12 jours à 28° ; j'ai alors dosé le sucre restant.

	Sucre restant pour 100.
Témoin.....	21,33
Neunkirchen.....	0,24
Bass.....	0,28
Pilsen.....	0,35
18 (Copenhague).....	1,11
Hofbraü.....	2,08
Pancsova.....	2,08
Weihenstephan.....	2,46
Augustinerbraü.....	3,09
Nuremberg.....	3,42
Dortmund I.....	4,16
Königshoff.....	4,57
Berlin II.....	4,61
Løevenbraü.....	4,89
Prague IV.....	5,10
Riga X.....	5,33
Schoumla.....	5,33

Nous constatons combien ces levures présentent entre elles de différences ; celles qui ont consommé le plus de sucre sont en général celles qui donnent les bières les plus alcooliques, comme Bass et Pilsen. J'ai choisi les levures suivantes : Neunkirchen, Bass, 48, Hofbraü, Weihenstephan, Lœvenbraü, Riga X, qui m'ont paru posséder les caractères les plus opposés ; j'y ai joint une levure de type Froberg, une levure de type Saaz, et enfin une levure haute de bière de Bruxelles.

La levure Bruxelles est une levure haute ; provenance : brasserie de Bruxelles. A peu près ronde. Elle mesure 6 à 8 μ de long sur 6 à 7 μ de large, meurt à l'état humide vers 55° ; elle ne m'a jamais donné de spores, sur blocs de plâtre, ni au bout de deux mois dans un matras Pasteur contenant une solution de lactose avec du bouillon Liebig et de la craie. Cultivée en gouttelettes à la surface de 10 c. c. de gélatine de touraillons stérile, la colonie creuse fortement la gélatine, la liquéfiant au bout de trois mois et demi environ.

La levure Froberg est une levure basse, clarifiant bien le liquide ; sa forme est elliptique, ses dimensions de 11 à 13 μ 5 pour la longueur, 6 à 8 μ pour la largeur. Je n'ai pas obtenu de spores, elle meurt à 50°. En gouttelette, elle présente à peu près les mêmes caractères que la levure Bruxelles, mais elle a liquéfié la gélatine au bout de deux mois.

La levure Neunkirchen est une levure basse ; provenance : Neunkirchen ; elle présente le caractère curieux de s'attacher sous forme de grumeaux très fortement aux parois du verre, de sorte qu'elle recouvre toute la surface du ballon que baigne le liquide, et il est parfois difficile de la détacher. Clarifie très bien. Sa forme est elliptique allongée ; 9 à 11 μ de long sur 4 à 5 μ de large. Elle meurt à l'état humide vers 50° et m'a fourni des spores au bout de 240 heures sur blocs de plâtre, et au bout de 15 jours dans le bouillon Liebig, lactose et craie. En gouttelette, la colonie s'étale beaucoup, liquéfiant à peine la gélatine après plus de six mois.

La levure Bass est celle qui sert à la fabrication de la bière anglaise connue sous le nom de *Pale-ale*. C'est une levure haute de forme ovale, mesurant 6 à 8 μ de long sur 4 à 6 μ de large. Elle meurt à 55°, et ne m'a pas donné de spores. En gouttelette, la colonie s'étale beaucoup, liquéfiant la gélatine au bout de cinq mois.

La levure 48, provenance Copenhague, est une levure basse, forme ovoïde, dépôt légèrement flottant. Les dimensions sont de 8 à 11 μ pour la longueur, de 6 à 8 μ pour la largeur. Je n'ai jamais obtenu de spores, et elle meurt à l'état humide vers 55°. En gouttelette, elle liquéfie la gélatine au bout de trois mois.

La levure Hofbraü est une levure basse de Munich, de forme ovale, mesu-

rant 8 à 9 μ de long sur 6 à 7 μ de large. Elle meurt vers 50° et ne m'a pas donné de spores. En gouttelette, elle s'étale assez fortement, en formant une colonie très vallonnée et très déprimée en son centre, liquéfiant la gélatine seulement au bout de quatre mois.

La levure Weihenstephan est une levure basse qui provient de l'Ecole de brasserie de Weihenstephan; sa forme est ovale, sa longueur 8 à 9 μ , sa largeur 5 à 6 μ . Elle meurt à l'état humide à 55°, et ne m'a fourni aucune spore. En surface, elle donne une colonie ramassée, d'une teinte gris rougeâtre clair, criblée d'aspérités, liquéfiant après 4 mois 1/2 de séjour.

La levure Saaz est une levure haute, de 9 à 12 μ de long sur 7 à 8 μ de large, présentant fréquemment des cellules de forme bizarre et contournée: meurt à 50°, elle m'a donné des spores au bout de quinze jours sur blocs de plâtre. En gouttelette, la colonie s'étale moyennement, liquéfiant un peu la gélatine après 4 mois.

La levure Lœvenbraü, levure basse de Munich, a le caractère précieux de se déposer parfaitement en gros grumeaux, en laissant le liquide très limpide. Elle est ovale et mesure 8 à 9 μ de long sur 6 à 7 μ de large. Elle meurt vers 50°; je n'ai pas pu obtenir de spores. En gouttelette, elle donne une colonie très ramassée, surélevée sur la gélatine, commençant à peine à la ramollir après 6 mois de séjour et malgré les chaleurs de l'été.

La levure Riga X est une levure basse de Russie, presque ronde, mesurant 8 μ de long sur 7 à 8 μ de large. Meurt à 55° et ne donne pas de spores. En gouttelette, colonie très plate, creusant à peine, liquéfiant au bout de 4 mois.

Signalons, avant de terminer, la dégénérescence de deux de ces levures. Les levures Bass et Neunkirchen sont celles qui ont servi en 1889 à M. Kayser à ses études sur l'action de la chaleur sur les levures¹. Elles avaient été conservées par régénérations successives tous les trois ou quatre mois. En 1889, elles résistaient à 60° à l'état humide. Aujourd'hui elles ne résistent plus qu'à 50°. D'autre part, la levure Bass avait, en 1889, la propriété de donner facilement des spores, et je n'ai pu en obtenir avec la levure actuelle. C'est là un fait qui a déjà été signalé par M. Hansen, que certaines espèces pouvaient dégénérer et perdre la faculté de donner des spores. M. Kayser m'a obligeamment fourni les ballons datant de 1889 où la levure Bass était conservée à l'état de spores depuis cette époque. Après régénération dans l'eau de navets, j'ai essayé sa résistance à la chaleur, et je me suis assuré qu'elle résistait à 55°, mais que la température de 60° lui était toujours mortelle. Plusieurs cultures successives n'ont pas modifié ce résultat. Il y a donc eu là encore dégénérescence, puisque la levure qui mourait à 65° en 1889 meurt maintenant

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889.

toujours à 60°. Cependant remarquons qu'à l'état de spores, la faculté de résistance à la chaleur s'est mieux conservée; la dégénérescence semble plus lente. En outre, cette levure, conservée à l'état de spores, a gardé sa propriété de fournir des spores au bout de peu de jours, tandis que la levure Bass régénérée tous les trois mois a perdu sa faculté de sporifier.

*
* *

J'ai ensuite ensemencé ces diverses levures dans un même moût de bière afin de comparer leurs atténuations. Les levures hautes ont marché à 18° pour la fermentation tumultueuse, puis à 12° pour la fermentation complémentaire : la durée a été de 35 jours. Les levures basses ont marché à 8° pendant 20 jours; la fermentation complémentaire s'est effectuée à 5° pendant deux mois et demi. Les analyses ont été faites d'après les procédés ordinaires des laboratoires : l'acidité évaluée à l'eau de chaux jusqu'à apparition du précipité floconneux; la maltose à la liqueur de Fehling par réduction directe; la dextrine par l'attaque durant 3 heures au bain-marie à 100° en présence d'acide chlorydrique à 16° Baumé, pour tout transformer en glucose, puis par titrage à la liqueur de Fehling; l'extrait au bain-marie à 100° comme pour les vins; l'alcool, par distillation, puis au compte-gouttes de M. Duclaux.

Ces analyses ont donné les résultats suivants :

	Acidité totale en gr. d'acide tar- trique par litre.	Maltose restant en grammes par litre.	Dextrine restant en grammes par litre.	Extrait sec à 100° en grammes par litre.	Alcool en grammes par litre.	Atténuation.	Rapport du non-maltose à maltose.
Bruxelles.....	0.90	42.0	24.7	45.0	48.8	73.8	2.7
Frohberg.....	0.87	9.3	20.9	40.4	52.7	76.5	3.3
Neunkirchen.....	1.20	9.7	20.0	40.6	52.4	76.3	3.2
Bass.....	1.10	17.1	28.2	55.9	45.6	67.4	2.3
48.....	0.77	10.2	21.1	31.5	51.8	75.8	3.0
Hofbrau.....	0.80	40.0	20.7	40.6	52.4	76.3	3.0
Weihenstephan.....	0.67	9.5	22.4	40.5	51.0	76.4	3.2
Löwenbrau.....	0.87	9.8	22.8	40.9	51.0	76.1	3.2
Riga X.....	0.84	40.0	23.7	40.8	49.1	76.2	3.0
Saaz.....	0.87	17.5	30.2	56.8	41.4	66.9	2.2
Témoin.....	"	106.6	36.4	171.8	"	"	0.6

Nous remarquons d'abord que l'atténuation est bonne partout : elle est poussée très loin avec les levures Frohberg, Neunkirchen et Weihenstephan qui tiennent la tête ; elle reste la plus faible avec la levure Saaz qui est un type à atténuation faible. L'acidité varie dans des limites assez considérables ; elle intervient dans le titre en azote de la bière en produisant la précipitation de certaines matières albuminoïdes, et en abaissant ainsi le taux pour cent d'azote de liquide fermenté. La maltose restante est en plus grande quantité dans les bières provenant des levures hautes que dans celles des levures basses. Dans ces dernières, la fermentation complémentaire qui s'est poursuivie très longtemps a permis à toutes ces levures de s'égaliser dans le moût de bière. Dans la quantité de dextrine restante, les différences s'accusent mieux. Les levures Frohberg, Neunkirchen, Hofbrau paraissent attaquer la dextrine en proportions notables. Il est difficile d'évaluer exactement ces proportions, car, d'une part, à la liqueur de Fehling, le procédé de dosage de la maltose est très imparfait, car on ne sait pas au juste quel est le pouvoir réducteur des subs-

tances que l'on dose. D'autre part, le dosage de la dextrine n'est pas plus rigoureux. Cependant, il y a des cas où la quantité de dextrine disparue est trop notable pour que l'on ne puisse considérer une partie de celle-ci comme ayant fermenté. C'est le cas des levures Froberg, Neunkirchen, Hofbrau, etc., avec lesquelles l'alcool produit dépasse d'ailleurs celui qui pourrait résulter de la fermentation de la maltose seule. Il en résulte pour ces levures une atténuation très forte; c'est l'inverse pour la levure Saaz. La diminution dans la proportion de dextrine est là trop faible pour que l'on puisse dire, vu l'imperfection des procédés de dosage, que la dextrine a été attaquée. Quant au rapport du non-maltose au maltose, il est plus fort avec la levure Froberg, la plus énergique; plus faible avec la levure Saaz.

*
* *

Parmi les éléments qui composent le moût de bière, l'azote est certainement un des plus importants : c'est un aliment indispensable à la levure, et sa présence dans la bière donne à celle-ci des propriétés nutritives particulières. Mais, d'autre part, si la bière reste trop riche en azote, elle devient altérable, plus difficile à clarifier et à conserver. Il y a donc en pratique une limite à atteindre de manière à laisser dans la bière une quantité d'azote suffisante pour qu'elle soit nutritive et agréable à boire, et cependant assez faible pour que le liquide se clarifie bien et se conserve de même. Pour arriver à ce résultat, le brasseur dispose de plusieurs moyens. D'abord, dans ses opérations de brassage, il précipite par la cuisson et par le houblonnage une certaine quantité de matériaux azotés. Puis la levure en consomme et emporte avec elle une autre partie variable avec sa richesse en azote et l'activité de sa prolifération.

J'ai cherché à savoir quelle était pour chacune de mes levures, dans un même moût de bière, la proportion d'azote enlevée et amenée à l'état insoluble par la levure elle-même ¹.

1. Cette question a déjà été étudiée, et tout récemment encore par M. Chas. F. Hyde et M. Briant (voir *Journal of the federated Institutes of Brewing*, 1895), mais ces savants ont opéré dans des conditions industrielles, c'est-à-dire sans séparer l'azote pris par la levure de celui qui se dépose à l'état de précipité pendant la fermentation. Consulter à ce sujet les travaux de MM. Wahl et Hantke, et les articles de M. A. Fernbach dans la *Bière*, 3^e année.

Pour arriver à ce résultat, il était d'abord indispensable d'opérer sur du moût de bière, de manière à comparer les levures dans leur milieu véritable. Ce moût de bière devait ne donner de dépôt ni pendant la stérilisation ni pendant la fermentation, afin que, celle-ci terminée, la levure y soit seule et qu'on puisse évaluer exactement son poids et sa richesse en azote. L'acidité croissante pendant la fermentation est le facteur principal de la précipitation qui se produit à ce moment.

Pour me mettre autant que possible à l'abri de cette cause d'erreur, j'ai additionné mon moût de 1 gramme d'acide oxalique par litre : après chauffage vers 100°, sans porter à l'ébullition, j'ai filtré la matière précipitée, puis neutralisé à la chaux de manière à éliminer complètement l'acide oxalique. Après filtration à clair, pour éviter la précipitation qu'aurait entraînée la stérilisation à l'autoclave, j'ai passé le moût à l'appareil Chamberland, pour la stérilisation à froid. Le moût limpide a été recueilli dans des matras flambés, et l'ensemencement a eu lieu au fil de platine, après 3 jours de repos à l'étuve à 28°, pour être assuré de la stérilité du liquide. J'ai pu ainsi obtenir un moût absolument clair et qui, pendant la fermentation, ne laissait précipiter aucune trace de matière azotée, comme j'ai pu m'en convaincre par de très nombreux examens microscopiques. La levure seule restait sur le filtre et j'ai pu dès lors calculer le poids du ferment, son azote et en conclure la quantité d'azote prise par chaque levure au moût.

L'azote a été dosé par le procédé bien connu de Kjeldahl-Aubin, sur la levure desséchée à l'étuve à 100°, ou sur 25 c. c. de moût fermenté. Voici les résultats obtenus dans un moût de bière contenant 0,640 d'azote total par litre. J'ai employé ce moût relativement pauvre en azote afin que la proportion d'azote prise par la levure soit une fraction notable de l'azote primitif et, par suite, pour que les différences soient facilement appréciables.

LEVURES	Poids de levure par litre.	Azote 0/0 de la levure.	Azote du moût par litre.	Proportion d'azote du moût prise par la levure.	Rapport de compara- raison.
Bruxelles.....	2 ^{gr} ,69	5.33	0.412	33.7	89
Bass.....	2 ^{gr} ,94	7.83	0.405	35.9	95
Saaz.....	3 ^{gr} ,25	7.42	0.385	37.6	100
Frohberg.....	3 ^{gr} ,41	6.77	0.422	32.8	87
Neunkirchen.....	2 ^{gr} ,84	6.34	0.445	28.1	74
48.....	2 ^{gr} ,90	8.11	0.401	36.7	97
Hofbrau.....	2 ^{gr} ,54	8.28	0.420	32.9	87
Weihenstephan.....	2 ^{gr} ,69	7.12	0.432	29.8	79
Meurant.....	2 ^{gr} ,97	5.63	0.456	26.0	69
Löwenbrau.....	2 ^{gr} ,62	9.00	0.400	36.8	97
Riga X.....	2 ^{gr} ,90	5.25	0.476	23.7	63
Maltose.....	2 ^{gr} ,13	5.18	0.500	17.1	45

La seule inspection de ce tableau nous révèle des différences profondes. Nous constatons d'abord que le taux pour cent d'azote de la levure varie beaucoup, bien que l'analyse pour tous les ballons ait été faite au moment même où la fermentation était terminée, de manière à éviter autant que possible les effets de la dénutrition sur les diverses levures. Les poids de levure par litre varient aussi beaucoup, presque du simple au double. Il en est de même pour la proportion d'azote du moût prise par la levure, qui est de 17 pour la levure maltose (levure trouvée dans le malt industriel), de 23 pour la levure Riga X, de 38 pour la levure Saaz. Les autres levures donnent des chiffres qui sont compris entre ces deux extrêmes: remarquons enfin que, règle générale, les levures hautes (Bruxelles, Bass, Saaz) ont un pouvoir très élevé pour l'élimination de l'azote.

Il est évident que ces chiffres n'ont pas de valeur absolue. La proportion centésimale d'azote du moût prise par la levure dépend en effet de la quantité d'azote présente dans le moût témoin. Les nombres que j'ai donnés seraient beaucoup plus faibles dans un moût riche en azote; mais, comparés entre eux,

ils permettent de se rendre compte des différences qui existent entre les levures. En prenant 100 comme chiffre d'élimination d'azote par la levure Saaz, qui tient la tête, on peut facilement calculer les chiffres correspondants aux autres levures ; c'est ce que j'ai indiqué dans la colonne intitulée : rapport de comparaison. On voit qu'il varie entre 45 et 100.

Il serait utile de ne pas se borner à l'étude de la quantité d'azote, de chercher la qualité de cet azote, et de quelle nature sont les matériaux azotés que la levure absorbe de préférence dans le moût et élimine à son tour de son protoplasma.

Malheureusement nos moyens d'études à ce sujet sont des plus incertains. J'ai pourtant essayé ce que donnait le dosage de l'azote albuminoïde par coagulation au moyen de l'hydrate de protoxyde de cuivre de Stutzer. Le procédé n'est pas parfait, car il n'y a pas que les matières albuminoïdes qui soient précipitées ; dans certaines conditions, une partie de la leucine peut être retenue. Néanmoins, je suis arrivé à conclure que les matières coagulées par l'hydrate de cuivre n'étaient que peu ou pas attaquées par les levures. Le moût témoin titrait par litre 0.230 d'azote albuminoïde, et j'ai tout retrouvé, dans la majorité des cas, dans le moût fermenté ; d'autres fois, les chiffres ont varié entre 0,220 et 0,230. On ne peut donc rien conclure. Peut-être y a-t-il ici une question d'élection. La levure, trouvant dans le moût la quantité de matériaux azotés nécessaire pour son développement et sous une forme qui lui plaît, s'est nourrie de l'azote amidé en laissant l'azote albuminoïde. Les choses se seraient peut-être passées tout autrement en l'absence de l'azote amidé.

J'ai dit plus haut que l'azote était dans la levure un élément en voie d'évolution incessante, et que par suite l'élimination de l'azote par la levure était très variable suivant l'époque où on l'étudie. Pour mieux voir comment avaient lieu ces variations, dans les conditions de mon expérience, j'ai ensemencé avec la levure Hofbrau du moût de bière préparé comme je l'ai indiqué, et j'y ai fait trois prises successives avec des pipettes flambées, au bout de 3 jours, 13 jours et 30 jours. Voici les résultats obtenus :

	3 jours.	13 jours.	30 jours.
Poids de levure 0/0.....	0.194	0.219	0.177
Axote de la levure 0/0.....	8.14	8.50	6.00
Azote du moût 0/0.....	0.082	0.078	0.086
Proportion 0/0 d'azote du moût pris par la levure.....	16.4	19.5	11.3
Maltose restante 0/0.....	3.90	4.3	0.90
Dextrine restante 0/0.....	3.02	2.09	2.04

Le moût témoin contenait 8,75 0/0 de maltose, 2,37 0/0 de dextrine et 0,97 0/0 d'azote. Nous voyons ici que l'azote de la levure arrive presque de suite au taux auquel il doit rester pendant la fermentation. C'est à peine si en dix jours il a augmenté de 0,36 0/0. Le poids de levure subit une variation analogue. La fermentation terminée, la levure rend de l'azote au moût, le poids de levure diminue, des globules se détruisent, le moût s'enrichit en azote. La proportion d'azote amenée à l'état insoluble par la levure est donc très variable. Elle est surtout élevée au moment où la fermentation est terminée (2^e prise); à partir de ce moment, elle diminue par suite de la restitution de l'azote au moût par la levure. C'est probablement par là que s'expliquent les résultats contradictoires de M. Hyde et de MM. Wahl et Hantke (*l. c.*). Nous constatons en outre qu'un tiers de la dextrine a disparu, et cela régulièrement jusqu'au treizième jour.

Enfin, j'ai cherché à savoir dans quelles proportions l'aération pouvait modifier la quantité d'azote enlevée au moût. A cet effet, j'ai ensemencé la levure basse Hofbrau et la levure haute Bruxelles, d'une part, en tube profond où le contact de l'air était très faible; d'autre part, en vase plat où le moût était étalé en couche très mince. Il est évident que les matières azotées sont ici enlevées partie par la levure, et partie par les précipitations produites par l'aération. Aussi il ne fallait pas songer à recueillir la levure pour la peser. J'ai dû me contenter du dosage de l'azote du moût fermenté clair. Les résultats ont été les suivants :

	Témoïn.	Levure Bruxelles		Levure Hofbräu	
		Vase plat.	Tube prof.	Vase plat.	Tube prof.
Maltose 0/0.....	13.82	1.86	2.77	2.70	2.45
Dextrine 0/0.....	5.50	3.08	3.11	2.99	3.25
Azote 0/0	0.185	0.165	0.173	0.167	0.175
Proportion 0/0 d'azote enlevé..	»	10.8	6.4	9.7	5.4

Nous constatons d'abord, ce que nous pouvions prévoir, que le moût fermenté du vase plat est moins azoté que celui du tube profond, et cela pour la levure haute et la levure basse dans les mêmes proportions. La quantité d'azote enlevée au moût est par suite bien supérieure en vase plat qu'en tube profond; elle est presque le double. C'est ce qu'avait déjà vu M. Briant. Mais on ne peut plus dire ici quelle est la portion de cet azote que la levure a employée à la construction de ses tissus; les précipitations produites dans la culture en surface empêchant d'une façon absolue le dosage de la levure et de sa teneur en azote.

Signalons enfin que la dextrine paraît être moins attaquée en profondeur qu'en surface; le résultat est surtout net avec la levure basse. Pour la maltose, nous constatons une différence entre les deux levures. La levure haute en fait moins disparaître en tube profond, c'est l'inverse pour la levure basse.

Nous voyons donc par ces quelques essais que les levures de bière se comportent très différemment dans leurs rapports avec l'azote du moût. Mais il importe de ne pas perdre de vue que la levure n'est pas la seule cause de la diminution de la richesse du moût en éléments azotés: il y a en outre les précipitations produites durant la fermentation, soit par l'acidité qui se forme, soit par l'aération. C'est de tous ces facteurs que dépend le taux d'azote de la bière: mais ici la question se complique et je ne veux pas l'aborder aujourd'hui.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE

AVRIL, MAI ET JUIN 1896

	A		B		C				
Morsures à la tête { simples	»	»	»	9	»	5	11		
et à la figure { multiples	»	2	2	8	17	»	6		
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»		
— inefficaces	»	»	»	4	»	»	3		
Pas de cautérisation	2	»	»	13	»	»	8		
Morsures aux mains { simples	»	7	12	»	63	119	»	31	53
— multiples	»	5	»	»	56	»	»	22	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	10	»	»	37	»	»	18	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	82	»	»	35	»	»
Morsures aux mem- { simples	»	5	12	»	47	71	»	32	64
bres et au tronc { multiples	»	7	»	»	24	»	»	32	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	6	»	»	27	»	»	38	»	»
Pas de cautérisation	6	»	»	44	»	»	26	»	»
Habits déchirés	10	»	»	52	»	»	50	»	»
Morsures à nu	2	»	»	19	»	»	14	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	0	0	»	1	1	»	3	3
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	1	»	»	3	»	»
Habits déchirés	»	»	»	»	»	»	1	»	»
Morsures à nu	»	»	»	1	»	»	2	»	»
<hr/>									
Totaux. { Français et Algériens	26	26	182	208	124	11			
{ Etrangers			26		7				
	A		B		C				
<hr/>									
TOTAL GÉNÉRAL 365									

Les animaux mordeurs ont été : chats : 12 fois; bœufs : 2 fois; chiens : 350 fois.

Un médecin qui soignait un malade atteint de la rage a reçu de la salive virulente sur une écorchure à vif.

Le Gérant : G. MASSON.

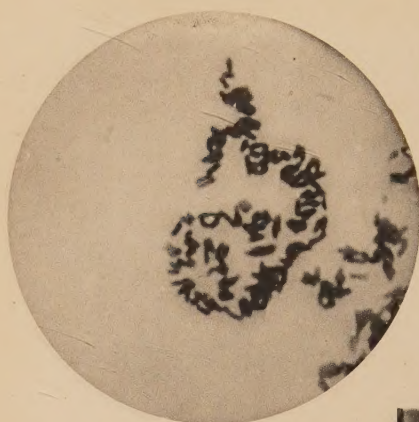


Fig. 1

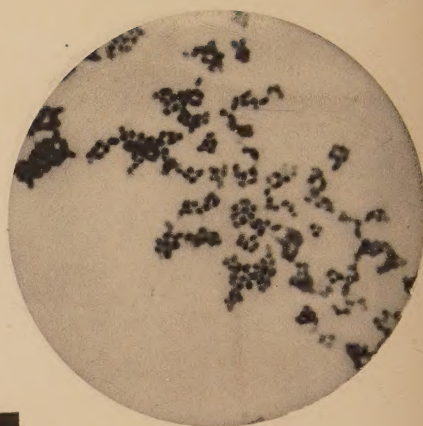


Fig. 2



Fig. 5

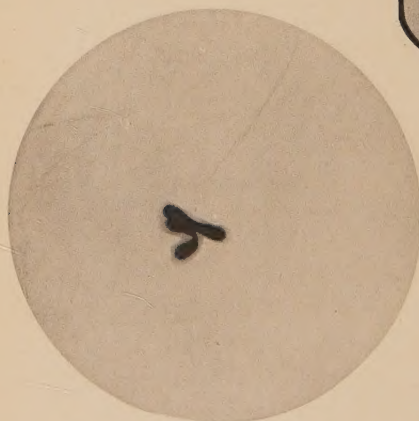


Fig. 3

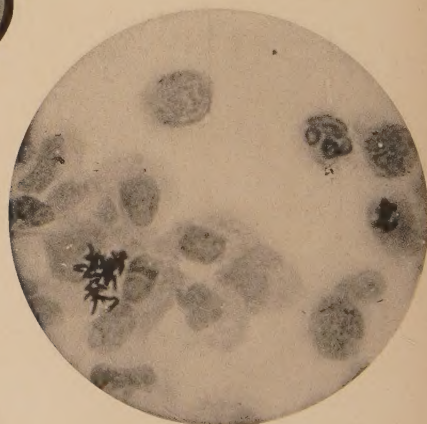


Fig. 4